



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Trabajo de Tesis Doctoral:

**GENERACIÓN FOTOQUÍMICA Y CARACTERIZACIÓN DE
ADUCTOS PTERINA-PIRIMIDINA EN NUCLEÓSIDOS,
OLIGONUCLEÓTIDOS Y ADN**

Tesista: Sandra Estébanez Ruiz

Directora: Dra. Carolina Lorente

Codirector: Dr. Andrés H. Thomas

Año: 2018

El presente trabajo de Tesis se realizó en el Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas bajo la dirección de la Dra. Carolina Lorente y la codirección del Dr. Andrés H. Thomas. Se presenta a consideración de las autoridades de la Facultad de Ciencias Exactas, de la Universidad Nacional de La Plata a fin de acceder al Grado Académico de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas.

A Rodrigo y a mi familia.

Agradecimientos

Me gustaría expresar mi agradecimiento a las instituciones y personas que hicieron posible que este trabajo de tesis saliera adelante:

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT - PICT-2012-0508), al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET - PIP 112-200901-0304) y a la Universidad Nacional de La Plata (UNLP - X712) por financiar los proyectos de investigación que hicieron posible la realización del presente trabajo de tesis. A la ANPCyT y al CONICET, por otorgarme las becas para realizar el doctorado.

A la ANPCyT, al Programa CSIC de Cooperación Científica para el Desarrollo (iCOOPLight, proyecto 20105CD0017) y al Gobierno de España (CTQ2015-70164-P) por financiar una parte de mis estancias en Valencia.

A las autoridades del Instituto de Investigaciones Teóricas y Aplicadas (INIFTA) por haberme permitido realizar las investigaciones de la tesis doctoral en esta institución, y a las de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV) y del Instituto de Tecnología Química (ITQ) por haberme permitido realizar allí las estancias del doctorado.

A mi directora, la Dra. Carolina Lorente, por haberme encaminado durante estos años para sacar adelante el trabajo. Por su dedicación y ayuda para discutir resultados y avanzar con la investigación.

Al Dr. Andrés H. Thomas, co-director de la tesis, por brindarme su tiempo, su conocimiento y buenos consejos. Por su apoyo y ayuda constante para resolver los problemas.

Al Dr. Miguel Ángel Miranda, que me admitió en su grupo de investigación para que pudiera realizar las estancias del doctorado.

A la Dra. Virginie Lhiaubet-Vallet por su incesante ayuda, especialmente con los estudios con los oligonucleótidos y el ADN. Por su tiempo y dedicación en todos mis viajes a Valencia. Porque no sólo es una gran científica, sino que es una excelente persona.

A la Dra. M^a Luisa Marín, por contagiarme sus ganas de trabajar y su energía. Por su completa disponibilidad para resolver problemas. Porque se preocupó de que no me faltara nada ni dentro ni fuera del laboratorio.

A la Dra. Patricia Vicendo por permitirme ir a conocer las instalaciones del Laboratoire des IMRCP de la Université Paul Sabatier (Toulouse) y realizar unas medidas de espectrometría de masas y a la Dra. Nathalie Martins-Froment por su buena disposición y colaboración con estos experimentos.

A Diana porque me ayudó y me enseñó todo cuando llegué. Me enseñó donde estaban los reactivos y materiales, a utilizar los equipos, a planificar experimentos, a analizar los resultados... y hasta cómo hacer los trámites de

migraciones! A Mariana Vignoni y a Maira por su ayuda con las medidas de espectrometría de masas, tanto en la realización como en el análisis. A Mariana Serrano por su ayuda con los experimentos de fotólisis de destello láser.

A “las pterinas”, tanto a las que estaban cuando llegué como a las nuevas incorporaciones: Laura, Mariana Vignoni, Mariana Serrano, Diana, Maira, Noel, Lara, Jae y Majo. Gracias por haberme ayudado siempre, por vuestro apoyo y palabras de consuelo cuando entraba en crisis, por haberme hecho disfrutar y reír, pero sobre todo... gracias por compartir horas de facturas, tortas y chocolate haciendo que el sentimiento de culpa disminuya!

A todo el personal del INIFTA, especialmente a la gente del primer piso y de la casita, por los buenos momentos vividos. A Bruno, por su paciencia y ayuda con las medidas de fotólisis de destello láser.

A los becarios del ITQ que desde el primer día me ayudaron y me consideraron una más del grupo. Especialmente, a Cristina, Ofelia, Rebeca, Faber, Ana, Mauri, Paloma, Isabel, Paula, María, Óscar y Rafa.

A mis amigos de la Universidad de Burgos por todos los momentos compartidos y por darme sus consejos. En especial a mis compañeros de innumerables cafés: Laura H., Elisa, Borja, Cristina, Erica, Leticia, Laura R. y Edna. También agradecer a Álvaro y Arancha por todo el tiempo que me han dedicado y porque gracias a ellos tuve la oportunidad de presentarme a esta beca.

A Laura, porque SIEMPRE está ahí sin importar el día ni la hora. Por apoyarme en cada decisión y aconsejarme con sinceridad. Por los incontables momentos que hemos vivido y me han ayudado a seguir adelante. Por no despegarse del teléfono durante estos cinco años por si necesitaba algo y por estar pendiente de que todo esté bien. Por esto y un millón de cosas más, GRACIAS!!

A mi familia, el pilar más importante de mi vida. Porque siempre me han cuidado, por todas sus palabras y gestos de aliento, porque me animan a seguir y a luchar por lo que quiero.

Me gustaría hacer un agradecimiento especial a mis padres porque sin ellos no lo hubiera conseguido. Por su amor incondicional, por sus buenas recomendaciones, por su paciencia, por su apoyo emocional y económico, por ofrecerme una buena educación y por un montón de cosas más. Un millón de gracias!

A Rodrigo, porque ha permanecido junto a mí en todo momento apoyándome en cada decisión. Porque por muy mal que estén las cosas siempre me saca una sonrisa, por aceptar mis locuras, por mimarme y arroparme constantemente y por su paciencia infinita. Por el enorme sacrificio que hizo durante varias ocasiones, quedándose sólo para que yo pueda disfrutar de mi familia y realizar las estancias en Valencia. Por hacerme la vida más fácil. Gracias de corazón.

Índice

PREFACIO	I
OBJETIVOS	II
I) INTRODUCCIÓN	1
1. INTRODUCCIÓN A LA FOTOQUÍMICA Y A LA FOTSENSIBILIZACIÓN	3
1.1. PROCESOS FOTOFÍSICOS	3
1.2. PROCESOS FOTOQUÍMICOS	7
1.3. FOTSENSIBILIZACIÓN	8
1.3.1. Transferencia de energía	9
1.3.2. Transferencia electrónica	10
1.4. OXIDACIONES FOTSENSIBILIZADAS	10
1.4.1. Mecanismo Tipo I	11
1.4.2. Mecanismos Tipo II	12
2. DAÑOS EN EL ADN POR LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA	13
2.1. EL ADN Y SUS COMPONENTES	13
2.1.1. Estructura química y propiedades de los nucleótidos	13
2.1.2. El ácido desoxirribonucleico	17
2.2. DISTRIBUCIÓN DE LA RADIACIÓN SOLAR EN LA TIERRA	18
2.3. EFECTOS BIOLÓGICOS DE LA RADIACIÓN UV EN EL ADN	19
2.4. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA RADIACIÓN ELECTROMAGNÉTICA EN EL ADN	20
2.4.1. Daño directo al ADN	22
2.4.2. Daño al ADN por procesos fotosensibilizados	23
3. PROPIEDADES QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS DE LAS PTERINAS	27
3.1. ESTRUCTURA QUÍMICA	27
3.2. PROPIEDADES ÁCIDO-BASE Y EQUILIBRIO TAUTOMÉRICO	28
3.3. ESPECTROS DE ABSORCIÓN	30
3.4. REACTIVIDAD QUÍMICA DE LAS PTERINAS	30
3.5. LAS PTERINAS EN LA NATURALEZA	31
3.5.1. Pigmentos en insectos	31
3.5.2. Ácido fólico	32
3.5.3. Tetrahidrobiopterina	32
3.5.4. Neopterinina	33

3.5.5. Pterinas como fotorreceptores	34
3.6. VITILIGO	35
4. FOTOQUÍMICA Y FOTSENSIBILIZACIÓN DE LAS PTERINAS	39
4.1. FOTOFÍSICA DE PTERINAS	39
4.1.1. Propiedades de los estados excitados singlete	39
4.1.2. Propiedades de los estados excitados tripletes	40
4.2. REACTIVIDAD FOTOQUÍMICA DE PTERINAS AROMÁTICAS	41
4.3. PROPIEDADES FOTSENSIBILIZADORAS DE LAS PTERINAS	42
4.3.1. Efectos fotodinámicos sobre células eucariotas	43
4.3.2. Inactivación fotodinámica de bacterias	43
4.3.3. Fotosensibilización de aminoácidos y proteínas	43
4.3.4. Fotosensibilización del ADN y sus componentes	44
II) MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES	49
5. PREPARACIÓN E IRRADIACIÓN ESTACIONARIA DE DISOLUCIONES	51
5.1. REACTIVOS	51
5.2. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES	52
5.3. EXPERIMENTOS EN CONDICIONES ESPECIALES	54
5.3.1. Bajo diferentes atmósferas	54
5.3.2. En presencia de yoduro de potasio	55
5.3.3. En presencia de superóxido dismutasa	56
5.4. IRRADIACIÓN ESTACIONARIA DE LAS DISOLUCIONES	56
5.4.1. Sistemas de irradiación	57
5.4.2. Metodología general para la toma de muestras	58
5.5. ACTINOMETRÍA	59
6. ANÁLISIS DE LAS DISOLUCIONES. PARTE I	63
6.1. ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE	63
6.2. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN	63
6.2.1. Purificación de productos con HPLC	65
6.3. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ULTRA-ALTA RESOLUCIÓN CON DETECCIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS	66
7. ANÁLISIS DE LAS DISOLUCIONES. PARTE II	71
7.1. ESPECTROSCOPIA DE EMISIÓN	71
7.1.1. Descripción del equipo	71
7.1.2. Espectros de emisión en estado estacionario	73

7.1.3. Emisión con resolución temporal	74
7.1.4. Oxígeno molecular singlete	76
7.1.5. Titulación espectrofluorimétrica	79
7.2. FOTÓLISIS DE DESTELLO LÁSER	79
7.2.1. Fundamento teórico	79
7.2.2. Descripción del equipo	80
7.2.3. Decaimientos y espectros de especies transitorias	80

III) RESULTADOS

83

8. FOTOSENSIBILIZACIÓN DE TIMIDINA INDUCIDA POR PTERINA EN PRESENCIA DE OXÍGENO	85
8.1. PTERINA COMO FOTOSENSIBILIZADOR DE TIMIDINA	86
8.1.1. Evaluación de la participación de O ₂ en la reacción fotosensibilizada	88
8.2. INTERACCIÓN DE LOS ESTADOS EXCITADOS DE PTERINA CON TIMIDINA	90
8.2.1. Desactivación del estado excitado singlete	90
8.2.2. Desactivación de los estados excitados tripletes	92
8.3. ANÁLISIS MECANÍSTICO DEL PROCESO	94
8.3.1. Papel del O ₂	94
8.3.2. Irradiación en presencia de yoduro de potasio	95
8.3.3. Factibilidad termodinámica del proceso fotoinducido de transferencia electrónica	95
8.3.4. Irradiación en presencia de superóxido dismutasa	96
8.3.5. Mecanismo de reacción propuesto	97
8.4. INVESTIGACIÓN DE LOS PRODUCTOS POR UPLC-MS	98
9. FOTOSENSIBILIZACIÓN DE TIMIDINA INDUCIDA POR PTERINA EN AUSENCIA DE OXÍGENO. GENERACIÓN FOTOQUÍMICA DE ADUCTOS FLUORESCENTES	105
9.1. FOTOSENSIBILIZACIÓN DE NUCLEÓTIDOS POR PTERINA EN AUSENCIA DE O ₂	105
9.2. FORMACIÓN DE ADUCTOS FLUORESCENTES ENTRE PTERINA Y TIMIDINA	109
10. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE ADUCTOS FLUORESCENTES GENERADOS ENTRE PTERINA Y NUCLEÓSIDOS	115
10.1. ANÁLISIS DEL ADUCTO PTERINA–TIMIDINA POR UPLC-MS	115
10.1.1. Generación de aductos con otros fotosensibilizadores	122
10.2. ANÁLISIS DEL ADUCTO PTERINA–CITIDINA POR UPLC-MS	126
11. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN FOTOFÍSICA DEL ADUCTO PTERINA–TIMIDINA	131

11.1. AISLAMIENTO DEL ADUCTO	131
11.2. CARACTERIZACIÓN FOTOFÍSICA DEL ADUCTO	133
11.2.1. Espectro de absorbancia	133
11.2.2. Fluorescencia	135
12. GENERACIÓN FOTOQUÍMICA DE ADUCTOS FLUORESCENTES EN OLIGONUCLEÓTIDOS	139
12.1. FOTOSENSIBILIZACIÓN DE UN OLIGONUCLEÓTIDO DE TIMINA INDUCIDA POR PTERINA EN AUSENCIA DE O ₂	139
12.2. FOTOSENSIBILIZACIÓN DE UN OLIGONUCLEÓTIDO DE TIMINA INDUCIDA POR PTERINA EN PRESENCIA DE O ₂	148
12.3. PROPIEDADES DEL ADUCTO PTERINA–TIMINA GENERADO EN EL OLIGONUCLEÓTIDO DE TIMINA	151
12.4. GENERACIÓN DE ADUCTOS FLUORESCENTES EN OTROS OLIGONUCLEÓTIDOS	154
12.4.1. Fotosensibilización de un oligonucleótido de citosina inducida por pterina	155
12.4.2. Fotosensibilización de un oligonucleótido de guanina inducida por pterina	157
12.4.3. Fotosensibilización de oligonucleótidos de secuencia mixta inducida por pterina	158
12.5. GENERACIÓN DE ADUCTOS FLUORESCENTES EN OLIGONUCLEÓTIDOS DE DOBLE HEBRA	161
13. GENERACIÓN FOTOQUÍMICA DE ADUCTOS FLUORESCENTES EN EL ADN	165
13.1. FOTOSENSIBILIZACIÓN DE ADN EUCARIOTA EN AUSENCIA DE O ₂	165
13.2. FOTOSENSIBILIZACIÓN DE ADN EUCARIOTA EN PRESENCIA DE O ₂	170
13.3. PROPIEDADES FLUORESCENTES DEL ADUCTO PTERINA–TIMINA GENERADO EN ADN	172
IV) CONCLUSIONES	177
V) BIBLIOGRAFÍA	181
ANEXO: ABREVIATURAS Y NOMENCLATURA	195

PREFACIO

La radiación UV es la porción más energética del espectro solar que alcanza la superficie terrestre. Este tipo de radiación, y en mucha menor proporción, la luz visible, es capaz de modificar la estructura química de ciertas macromoléculas y metabolitos presentes en los tejidos. En particular, los cambios químicos sufridos por las proteínas y por el ácido desoxirribonucleico (ADN) llevan a consecuencias dramáticas para las células. Dichos efectos van desde disfunciones en el metabolismo celular hasta la muerte, pasando por la generación de mutaciones en la secuencia de bases del ADN. La formación de mutaciones puede conducir a la proliferación sin control de la célula, con la consiguiente generación de un proceso neoplásico en el tejido que la contiene.

Existen básicamente dos grupos de mecanismos mediante los cuales la radiación electromagnética modifica o daña al ADN, a las proteínas y a sus componentes. Los procesos directos se inician con la absorción de fotones por los cromóforos de las macromoléculas (las bases nitrogenadas en el ADN y determinados aminoácidos en el caso de las proteínas). Los estados electrónicamente excitados de estos componentes reaccionan generando cambios químicos que alteran la estructura de la macromolécula. Estos procesos ocurren normalmente con una frecuencia muy baja porque gran parte de la radiación que absorben las bases nitrogenadas y los aminoácidos (UV-B) es filtrada por la atmósfera, haciendo que este tipo de radiación prácticamente no alcance la superficie terrestre.

El otro grupo de procesos fotoquímicos que dañan a las macromoléculas son los indirectos. En los mismos, un segundo compuesto denominado fotosensibilizador o simplemente sensibilizador, es el que absorbe la radiación y se vuelve reactivo. La radiación UV-A (320 – 400 nm) y visible no son filtradas por la atmósfera y pueden, por consiguiente, ser absorbidas por diversos fotosensibilizadores. El fotosensibilizador excitado puede “atacar” a la macromolécula a través de una serie de mecanismos, siendo los más importantes la transferencia de energía del sensibilizador al sustrato y las oxidaciones fotosensibilizadas. Estas últimas pueden ocurrir a partir de la transferencia de electrones entre el sensibilizador y el sustrato (tipo I) o mediante la oxidación del sustrato por oxígeno singlete, generado fotoquímicamente por el sensibilizador (tipo II).

A partir del descubrimiento, relativamente reciente, de estos procesos fotosensibilizados, se inició la búsqueda y estudio de compuestos que pudieran actuar como fotosensibilizadores. La investigación en este campo persigue varios objetivos. Por un lado, la identificación de sensibilizadores permite evitar la exposición a los mismos. Por otro lado, se pretende entender mejor los mecanismos implicados en la generación de procesos neoplásicos provocados por la radiación solar. Por último, se han desarrollado diversas aplicaciones basadas

en el uso de fotosensibilizadores como sistemas de esterilización y técnicas de terapia fotodinámica.

En la actualidad se conocen numerosos grupos de compuestos heterocíclicos que actúan como fotosensibilizadores. Entre ellos se encuentran las porfirinas, las ftalocianinas, las flavinas, las lumazinas y las pterinas. Estas últimas pertenecen a una familia de compuestos orgánicos heterocíclicos que están presentes en una amplia variedad de sistemas vivos, y además, participan en numerosas funciones biológicas importantes. Bajo excitación UV-A, las pterinas pueden fluorescer, experimentar fotooxidación y generar especies reactivas de oxígeno.

Hace aproximadamente 10 años se demostró que las pterinas son capaces de participar en la degradación fotosensibilizada de ADN. Más recientemente, se estudiaron los mecanismos implicados en la oxidación de los nucleótidos fotoinducida por pterina (Ptr) bajo irradiación UV-A en disoluciones acuosas. En estos trabajos se demostró que Ptr es capaz de actuar como fotosensibilizador, tanto en fotooxidaciones tipo I como tipo II. La contribución de ambos tipos de mecanismos en un determinado proceso depende de varios factores, tales como la naturaleza del sustrato y el pH.

La fotoquímica de las pterinas, y en particular, aquellos procesos en los cuales estos compuestos participan como sensibilizadores, es muy interesante desde el punto de vista fisicoquímico. A su vez, las pterinas revisten gran interés biomédico, ya que en algunas patologías se acumulan en la piel y, bajo irradiación UV-A, podrían estar implicadas en procesos fotoquímicos nocivos para la salud, como la generación de cáncer de piel.

OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis doctoral es investigar los procesos fotosensibilizados por pterinas de bases pirimidínicas que forman parte de diferentes sustratos en condiciones aneróbicas. Para ello se trabajó con Ptr, que es el compuesto modelo no sustituido de las pterinas oxidadas. Como sustratos se emplearon nucleótidos, nucleósidos, oligonucleótidos y ADN eucariota.

A continuación se detallan los objetivos específicos que han dirigido el desarrollo de la tesis:

- Estudiar el proceso fotosensibilizado del nucleósido de timina por Ptr bajo diferentes condiciones experimentales y dilucidar el mecanismo de reacción.
- Comparar la eficiencia de los procesos fotosensibilizados en nucleótidos y nucleósidos por Ptr en condiciones anaeróbicas. Concretamente, realizar un estudio sobre la generación de aductos fluorescentes entre el fotosensibilizador y el sustrato.
- Caracterizar estructuralmente dichos aductos.
- Analizar las propiedades fotofísicas de aductos pterina-timina.

- Investigar la generación de aductos fluorescentes en oligonucleótidos, tanto de hebra simple como de hebra doble.
- Estudiar el daño sufrido por moléculas de ADN eucariota en procesos fotosensibilizados por Ptr.
- Realizar un análisis acerca de la formación de aductos pterina-timina en moléculas de ADN.

i) INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN A LA FOTOQUÍMICA Y A LA FOTOSENSIBILIZACIÓN

Cuando una molécula absorbe radiación electromagnética pasa desde un estado cuántico de baja energía a otro de mayor energía. La especie en estado electrónico excitado es inestable y tiende a liberar el exceso de energía a través de un proceso químico, modificando su estructura química, o físico, permaneciendo inalterada.

1.1. PROCESOS FOTOFÍSICOS

La desactivación de una molécula excitada mediante un proceso físico ocurre rápidamente, y puede tener lugar a través de diferentes vías. El camino más favorable estará influenciado por las propiedades del medio, por el tipo de molécula y por la naturaleza de los estados electrónicos involucrados. Dentro de este tipo de procesos se encuentran las transiciones radiativas, las transiciones no radiativas y los procesos de desactivación o *quenching*. En la [Figura 1](#) se muestra un diagrama de Jablonski modificado, donde se simbolizan las transiciones radiativas y no radiativas. Este esquema representa los niveles de energía simplificados de una molécula. Los niveles vibro-rotacionales asociados a los estados electrónicos se simbolizan con líneas horizontales. Las flechas rectas hacen referencia a los procesos radiativos, mientras que las flechas curvas aluden a los procesos no radiativos. Como puede observarse, en las transiciones radiativas, la molécula excitada regresa a su estado de menor energía emitiendo radiación electromagnética, que es de menor energía (de mayor longitud de onda) que la que fue necesaria para generar el estado excitado. En cambio, en las transiciones no radiativas, la molécula excitada regresa a su estado basal por la transferencia de energía, sin emisión de la radiación. Por último, en los procesos de *quenching*, el exceso de energía que posee la molécula excitada se transfiere a otra especie que se encuentre en el medio.

En general, las moléculas orgánicas se encuentran en su estado electrónico de menor energía, que habitualmente es un estado singlete (S_0). Cuando la molécula absorbe radiación electromagnética, un electrón se promueve a un orbital de mayor energía. El estado electrónico alcanzado continuará siendo singlete (S_1 , S_2 , etc.). Desde el estado S_1 puede tener lugar un cambio de multiplicidad, generando un estado excitado triplete (T_1) ([Figura 2](#)). El T_1 posee menos energía que el S_1 debido a que al estar los dos electrones desapareados en diferentes orbitales, la energía de repulsión electrón-electrón es menor.

Las transiciones $S_0 \rightarrow S_1$ poseen bandas de absorción intensas, mientras que las bandas de las transiciones $S_0 \rightarrow T_1$ son más débiles. Esto se debe a que las transiciones con cambio de multiplicidad están “prohibidas por espín”, y por lo tanto, la probabilidad para que ocurran es más baja. Habitualmente, la excitación

al primer estado excitado singlete (S_1) es el proceso más favorable. Sin embargo, también se puede dar la transición a un segundo estado excitado singlete ($S_0 \rightarrow S_2$).

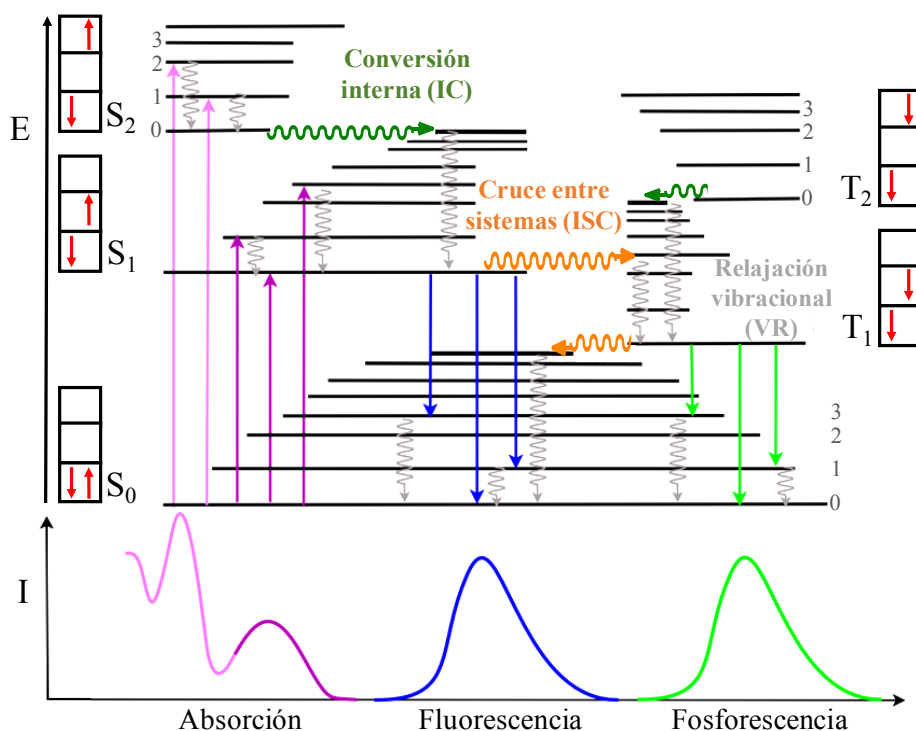


Figura 1. Diagrama de Jablonski modificado.

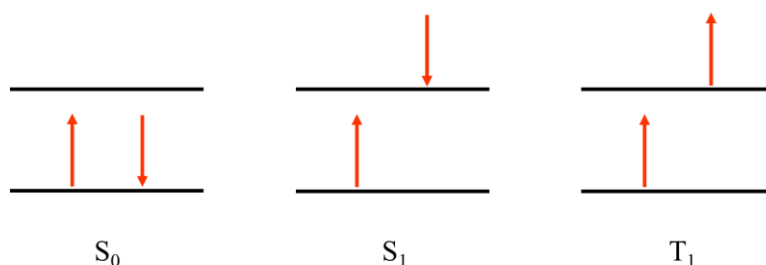


Figura 2. Distribución de electrones en los estados electrónicos S_0 , S_1 y T_1 .

Las transiciones no radiativas pueden ocurrir entre estados de la misma o de diferente multiplicidad. Los primeros se denominan procesos de conversión interna (IC) y los segundos, cruce entre sistemas (ISC). Las transiciones entre estados por IC o ISC dejan a la molécula con un exceso de energía vibro-rotacional, que se disipa rápidamente por la colisión con las moléculas del disolvente a través de un proceso conocido como relajación vibracional (VR).

Los procesos de desactivación radiativos son la fluorescencia y la fosforescencia. En la fluorescencia ($S_1 \rightarrow S_0$), la transición de un estado electrónico a otro ocurre sin cambio en la multiplicidad de espín. Este proceso es permitido (en términos de la teoría de la mecánica cuántica) y ocurre rápidamente. Por el

contrario, la fosforescencia ocurre entre estados de diferente multiplicidad ($T_1 \rightarrow S_0$), siendo una transición poco probable o “prohibida por espín”. La fosforescencia generalmente es menos intensa y más lenta que la fluorescencia. Ambas se pueden determinar experimentalmente para conocer más detalles sobre la naturaleza y el comportamiento de los estados electrónicos excitados. En los procesos radiativos, la emisión ocurre a mayores longitudes de onda que la radiación absorbida al generar el estado excitado. Este efecto se conoce como desplazamiento de Stokes y se debe a la pérdida de energía por la relajación térmica de la molécula excitada para alcanzar el menor estado vibro-rotacional (dentro del mismo estado). Esto tiene lugar a través de diversos fenómenos fisicoquímicos, como por ejemplo, la disipación de energía vibracional, la redistribución de los electrones en las moléculas del disolvente, procesos de tautomerización, reorientación de las moléculas del disolvente e interacciones entre la molécula excitada y las moléculas del disolvente [Lakowicz, 2006].

La relajación del estado excitado por desactivación física o *quenching*, ocurre cuando en el medio de reacción se encuentra otra especie química que puede interactuar con la molécula en estado excitado, conocida como desactivador (Reacción 1). Así, la molécula en estado excitado (A^*) transfiere el exceso de energía al desactivador (Q), generalmente mediante una colisión. La ecuación de velocidad de dicho proceso queda representada en la Ecuación 1, donde k_q es la constante de velocidad bimolecular de desactivación. La intensidad de la radiación disminuye en función de la cantidad de desactivador y de la eficiencia del proceso. Además, la presencia del desactivador aumenta la velocidad del decaimiento de la emisión. Por lo tanto, medidas de la intensidad de emisión y su dependencia con el tiempo proporcionan información sobre las velocidades de reacción entre la molécula excitada y el desactivador [Gilbert, 1991].



$$v = k_q[A^*][Q] \quad \text{Ecuación 1}$$

La desactivación física puede tener lugar con un *quenching* colisional o dinámico, como resultado de los choques generados entre las moléculas del fluoróforo y del desactivador, o mediante un *quenching* estático debido a la formación de complejos.

Una gran variedad de sustancias pueden actuar como desactivadores de estados excitados, y por ello, es importante identificar los que son de interés para la especie en estudio. Un ejemplo representativo es la desactivación de estados excitados tripletes por O_2 molecular, motivo por el cual se elimina de las disoluciones sobre las que se van a medir sus tiempos de vida y rendimientos cuánticos.

Dado un proceso de desactivación dinámica, se puede calcular la constante de velocidad del proceso registrando los espectros de emisión del compuesto en

estudio en presencia y en ausencia de desactivador y aplicando la ecuación de Stern-Volmer ([Ecuación 2](#)):

$$\frac{I_{em}^0}{I_{em}} = 1 + K_{SV}[Q] = 1 + k_q\tau^0[Q] \quad \text{Ecuación 2}$$

I_{em}^0 e I_{em} son las intensidades de emisión en ausencia y en presencia del desactivador respectivamente, K_{SV} es la constante de Stern-Volmer, $[Q]$ es la concentración de desactivador, k_q es la constante de desactivación bimolecular y τ^0 es el tiempo de vida de la especie emisora en ausencia de desactivador.

Esta ecuación se puede deducir planteando el estado estacionario para la especie excitada en presencia de un desactivador [[Lakowicz, 2006](#)]. El desactivador puede ser cualquiera, pero debe permanecer químicamente invariable para que la disminución de la fluorescencia, es decir, de la concentración del estado excitado, se deba a una única interacción entre la molécula emisora y el desactivador.

Los rendimientos cuánticos de emisión en ausencia (Φ_{em}^0) y en presencia (Φ_{em}) de desactivador vienen dados por las [Ecuaciones 3](#) y [4](#), respectivamente.

$$\Phi_{em}^0 = \frac{k_{em}^0}{k_{em}^0 + \sum k_i} = \frac{k_{em}^0}{k_{em}} \quad \text{Ecuación 3}$$

$$\Phi_{em} = \frac{k_{em}^0}{k_{em}^0 + \sum k_i + k_q[Q]} = \frac{k_{em}^0}{k_{em} + k_q[Q]} \quad \text{Ecuación 4}$$

La constante de velocidad de emisión espontánea (k_{em}) es igual a la suma de las constantes de velocidad que contribuyen al decaimiento de A^* , excepto k_q ($k_{em} = k_{em}^0 + \sum k_i$). El valor máximo del rendimiento cuántico de emisión se obtiene en ausencia de desactivador, ya que disminuye con el incremento de su concentración. La relación entre los rendimientos cuánticos de emisión en presencia y en ausencia de desactivador viene dado por la [Ecuación 5](#).

$$\frac{\Phi_{em}^0}{\Phi_{em}} = \frac{k_{em}^0}{k_{em}} \frac{k_{em} + k_q[Q]}{k_{em}^0} = 1 + \frac{k_q[Q]}{k_{em}} \quad \text{Ecuación 5}$$

La [Ecuación 5](#) indica que la relación entre los Φ_{em} es linealmente dependiente de la concentración de desactivador, y es conocida como relación de Stern-Volmer. La determinación de Φ_{em} requiere del conocimiento de la intensidad de radiación absorbida. Sin embargo, si se registra la intensidad de fluorescencia en función de la concentración del desactivador en idénticas condiciones, la radiación absorbida es la misma en todas las medidas. El término “idénticas condiciones” hace referencia a la geometría de irradiación, concentración de la molécula emisora, intensidad de excitación, longitud de onda y sensibilidad del detector. En

estas condiciones, la relación entre los rendimientos cuánticos de emisión es igual a la relación de las intensidades de emisión ([Ecuación 6](#)).

$$\frac{I_{em}^0}{I_{em}} = 1 + \frac{k_q [Q]}{k_{em}} \quad \text{Ecuación 6}$$

Así, una gráfica de I_{em}^0/I_{em} en función de $[Q]$ es una recta que intercepta en la unidad al eje I_{em}^0/I_{em} y cuya pendiente es K_{SV} , que equivale a $k_q/k_{em} = \tau^0 k_q$.

El análisis de las gráficas de Stern-Volmer permite adquirir información muy relevante. Por ejemplo, determinar K_{SV} es un método indirecto para obtener el valor de τ^0 si se conoce k_q , o bien, calcular k_q si se conoce τ^0 . Por otro lado, una gráfica Stern-Volmer lineal generalmente indica la presencia de un sólo fluoróforo, mientras que si no es lineal se puede suponer la presencia de dos poblaciones de especies emisoras (entre otros mecanismos). Merece la pena aclarar que una gráfica lineal no asegura que el proceso de desactivación sea dinámico, ya que los procesos estáticos también pueden presentar comportamientos lineales.

Se puede deducir que si la desactivación es de tipo dinámico, el cociente de los tiempos de vida en ausencia y en presencia de desactivador (τ^0/τ) es igual al correspondiente cociente de los rendimientos cuánticos de emisión (Φ_{em}^0/Φ_{em} o I_{em}^0/I_{em}).

$$\Phi_{em}^0 = k_{em}^0 \tau^0 \quad \text{Ecuación 7}$$

$$\Phi_{em} = k_{em}^0 \tau \quad \text{Ecuación 8}$$

$$\frac{\Phi_{em}^0}{\Phi_{em}} = \frac{k_{em}^0 \tau^0}{k_{em}^0 \tau} = \frac{\tau^0}{\tau} \quad \text{Ecuación 9}$$

Por lo tanto, la dependencia de los tiempos de vida o las intensidades de emisión con la concentración del desactivador viene dada por la [Ecuación 10](#).

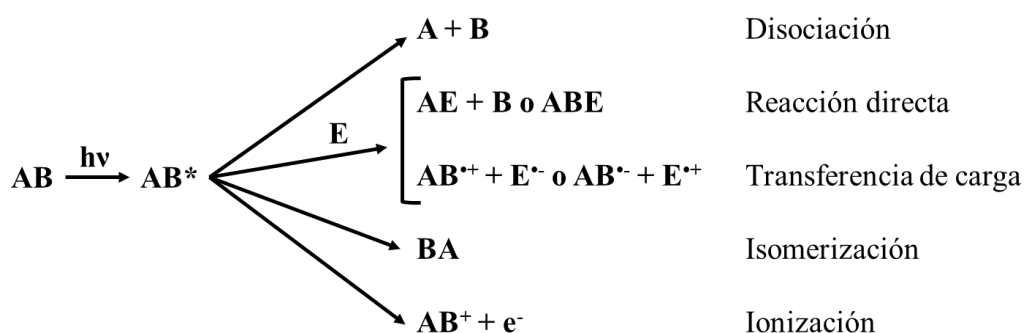
$$\frac{\tau^0}{\tau} = \frac{I_{em}^0}{I_{em}} = 1 + k_q \tau^0 [Q] \quad \text{Ecuación 10}$$

1.2. PROCESOS FOTOQUÍMICOS

Cuando una molécula absorbe radiación electromagnética y pasa a un estado de mayor energía, se vuelve más reactiva y aumentan las probabilidades de reacción [Turro, 1991]. Si este exceso de energía se emplea para promover una reacción química, se habla entonces de reacción fotoquímica. Esto puede ocurrir por distintos mecanismos, por ejemplo, la energía se puede utilizar para romper una unión química, para superar una energía de activación, etc. La reactividad

química de una molécula en su estado excitado puede ser muy diferente a la de esa misma molécula en su estado fundamental. Las reacciones fotoquímicas se pueden clasificar en función del tipo de transformación química (**Esquema 1**):

- i. Reacciones de disociación: la energía de la radiación debe ser suficiente para producir la ruptura de un enlace, generando la fragmentación de la molécula excitada.
- ii. Reacciones o procesos intermoleculares: la excitación de una molécula favorece la reacción con una segunda molécula (“E”), lo cual no era posible desde su estado fundamental. Pueden ser reacciones directas entre la molécula excitada y “E”, o procesos de transferencia de electrones entre ambas moléculas con la generación de especies radicalarias.
- iii. Procesos intramoleculares: una parte de una molécula en estado excitado interacciona con otra parte de la misma molécula. Estos procesos conducen a cambios estructurales de la molécula y/o procesos de isomerización.
- iv. Procesos de ionización: la energía de la radiación produce la separación de un electrón y, por lo tanto, la ionización de la molécula excitada. La molécula ionizada posteriormente sufre una transformación química, por ejemplo, por reacción con otra molécula.



Esquema 1. Tipos de reacciones fotoquímicas a partir del estado excitado de una molécula “AB”.

1.3. FOTOSENSIBILIZACIÓN

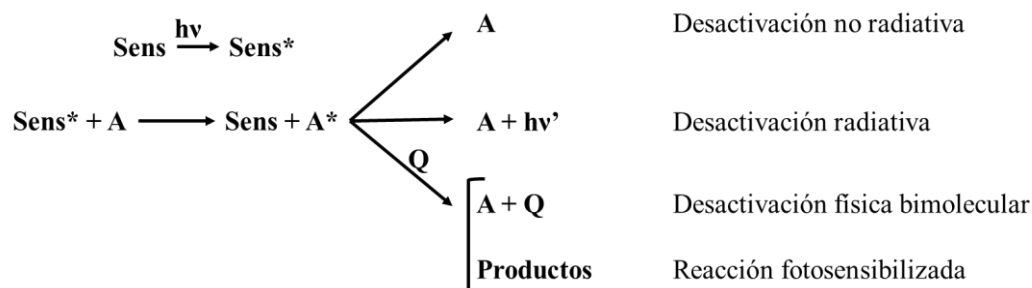
La fotosensibilización engloba un conjunto de procesos fotoquímicos en los que una especie química sufre una alteración fotoquímica o fotofísica como consecuencia de la absorción de radiación electromagnética por otra especie química, conocida como fotosensibilizador o sensibilizador (Sens) [Scaiano, 1989; Braslavsky, 2007]. A pesar de ser una definición amplia, es la más aceptada en el campo de la fotoquímica aplicada a reacciones de compuestos orgánicos y

procesos bioquímicos. Las reacciones fotosensibilizadas pueden ocurrir a través de la transferencia de energía o de carga.

1.3.1. Transferencia de energía

La fotosensibilización por transferencia de energía es un proceso en el cual una especie química electrónicamente excitada (dador) se desactiva al transferir su exceso de energía a otra especie química (aceptor). Ese exceso de energía produce una transición electrónica en el aceptor, poblando sus estados excitados (generalmente los de más baja energía, S_1 o T_1), que seguidamente se transforma en algún fenómeno químico o físico.

El **Esquema 2** representa los tipos de reacciones que pueden estar involucradas en este mecanismo.



Esquema 2. Procesos fotosensibilizados que ocurren a través de un proceso de transferencia de energía.

En primer lugar, se genera el estado excitado del sensibilizador (Sens^*) tras la absorción de un fotón. A continuación, el sensibilizador regresa a su estado basal transfiriendo su energía al aceptor (A). La energía transferida es menor a la absorbida inicialmente debido a la relajación vibro-rotacional. Por último, el estado excitado del aceptor se desactiva a través de cualquiera de las vías fotofísicas mencionadas en el **Apartado 1.1** o bien, puede sufrir alguno de los cambios químicos nombrados en el **Apartado 1.2**.

La transferencia de energía puede generar cambios químicos en el aceptor que no ocurren en ausencia de radiación y del fotosensibilizador. Además, esta vía alternativa de excitación puede poblar estados excitados distintos a los obtenidos por absorción directa y, por lo tanto, dar lugar a diferentes reacciones químicas [Wayne, 1996].

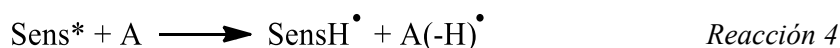
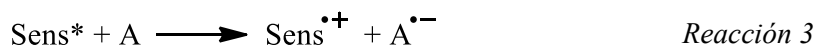
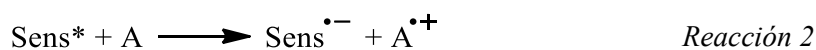
La transferencia de energía puede tener lugar a través de dos mecanismos [Braun, 1991]:

- Radiativo:** la energía se transfiere debido a que la molécula aceptora absorbe la radiación emitida en el proceso de desactivación de la molécula dadora (Sens) [Braslavsky, 2007].
- No radiativo:** requiere una interacción directa entre el estado excitado del sensibilizador y la molécula aceptora.

La transferencia de energía triplete-triplete es el tipo más frecuente e importante en fotoquímica orgánica. Generalmente se utiliza para generar estados excitados tripletes de moléculas con bajos rendimientos cuánticos de producción de este tipo de estados excitados. Es decir, existen compuestos que no pueden generar estados excitados tripletes por absorción directa de radiación pero que, sin embargo, pueden generarlos aceptando energía de un fotosensibilizador excitado adecuado. La eficiencia del proceso depende de las configuraciones de espín y de la energía relativa de los estados excitados del dador y del aceptor. Otro caso importante de transferencia de energía es la excitación fotosensibilizada del O₂ para generar oxígeno singlete (¹O₂), especie muy reactiva que participa en la generación de estrés oxidativo en sistemas biológicos.

1.3.2. Transferencia electrónica

Generalmente, las propiedades fisicoquímicas de una molécula en el estado excitado difieren de las propiedades de su estado basal. En particular, se pueden observar cambios en la acidez y en los potenciales redox. Cuando una especie química se oxida o se reduce por reacción con otra especie electrónicamente excitada, se dice que la transferencia de electrones es fotosensibilizada. En función de los potenciales redox de las dos especies involucradas en la reacción, el electrón es cedido (o aceptado) por una molécula en estado excitado hacia (o desde) un aceptor en su estado fundamental. Este proceso puede tener lugar por una transferencia electrónica propiamente dicha, generando el radical anión y el radical catión (**Reacciones 2 y 3**), o bien, mediante la abstracción de un átomo de hidrógeno, generando los radicales neutros (**Reacciones 4 y 5**).



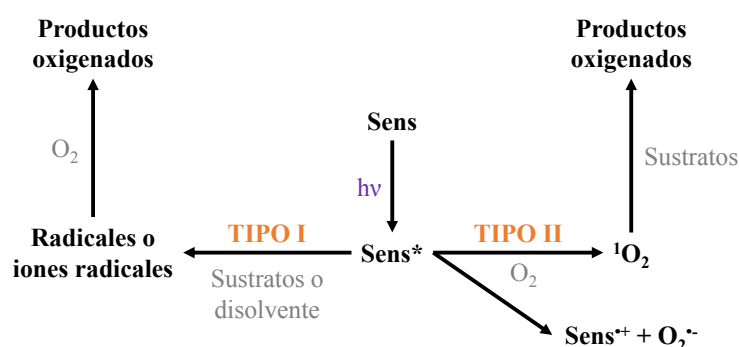
Posteriormente, los radicales formados pueden sufrir diferentes reacciones dependiendo de sus propiedades, de la presencia de otras especies en el medio y de las condiciones experimentales, tales como temperatura, pH y propiedades del disolvente.

1.4. OXIDACIONES FOTOSENSIBILIZADAS

Las fotooxidaciones son un conjunto de procesos fotoinducidos de gran importancia en sistemas biológicos. Si la fotooxidación ocurre en una molécula como resultado de la absorción de radiación por otra especie (sensibilizador), la

reacción es una oxidación fotosensibilizada. Estos procesos ocurren a través de un conjunto de mecanismos que pueden involucrar fenómenos de transferencia de energía o de electrones. El oxígeno que participa en las oxidaciones se puede encontrar en su estado triplete basal o en un estado excitado singlete [Klán, 2009].

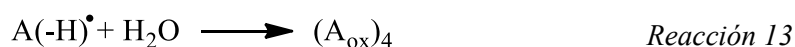
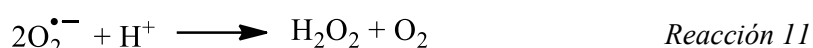
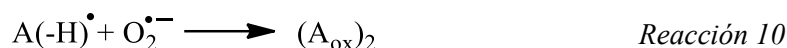
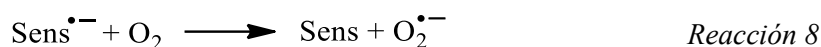
Probablemente, la clasificación más aceptada de los mecanismos de oxidaciones fotosensibilizadas es la propuesta por Foote (**Esquema 3**) [Foote, 1991; Baptista, 2017]. Como en cualquier proceso fotosensibilizado, la primera etapa consiste en la absorción de la radiación por el sensibilizador. De esta manera, se genera su estado excitado, que puede ser singlete o triplete. Esta especie excitada puede reaccionar con un sustrato o con el disolvente a través de un mecanismo Tipo I, o bien, con el O_2 mediante un mecanismo Tipo II.



Esquema 3. Oxidaciones fotosensibilizadas de Tipo I y Tipo II [adaptado de Foote, 1991].

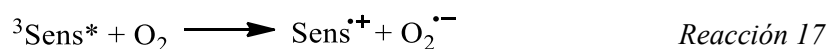
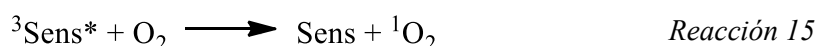
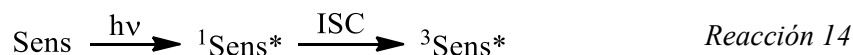
1.4.1. Mecanismo Tipo I

En los mecanismos Tipo I, el estado excitado del sensibilizador reacciona con el sustrato o con el disolvente mediante una reacción de transferencia electrónica, generando el radical anión y el radical catión. Por lo general, en los sistemas biológicos el sensibilizador actúa como aceptor de electrones y los sustratos, como por ejemplo nucleótidos y aminoácidos, operan como donores de electrones (**Reacción 6**). En función del pH del medio y de las correspondientes constantes de disociación ácida, el radical catión puede formar el radical neutro por la pérdida de un protón (**Reacción 7**). Simultáneamente, el radical anión puede reaccionar con el O_2 disuelto, generando el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (**Reacción 8**). Posteriormente, el $O_2^{\bullet-}$ puede reaccionar con el sustrato (**Reacción 9**) o con su radical neutro (**Reacción 10**) para generar productos oxigenados. El $O_2^{\bullet-}$ también puede sufrir una desproporción formando H_2O_2 (**Reacción 11**), que puede participar en otras reacciones de oxidación. Finalmente, el radical neutro también puede reaccionar con el O_2 (**Reacción 12**) o, si la reacción tiene lugar en medio acuoso, con el agua (**Reacción 13**) y generar otros productos oxigenados.



1.4.2. Mecanismos Tipo II

Los mecanismos Tipo II involucran la producción de $^1\text{O}_2$ por procesos de transferencia de energía. Como en todos los procesos fotosensibilizados, el estado excitado del sensibilizador se genera con la absorción de radiación por dicha especie (Reacción 14). El estado basal triplete del O_2 interacciona con el estado excitado triplete del fotosensibilizador, dando lugar a la desactivación del triplete del sensibilizador y a la formación de $^1\text{O}_2$ (Reacción 15). A continuación, esta especie altamente reactiva, oxida al sustrato (A) y genera los correspondientes productos oxigenados $(\text{A}_{\text{ox}})_1$ (Reacción 16). Por otra parte, puede darse una transferencia electrónica desde el sensibilizador hacia el O_2 , formando el radical catión del sensibilizador ($\text{Sens}^{\bullet+}$) y $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Reacción 17). Seguidamente, esta especie reactiva de oxígeno puede oxidar al sustrato (Reacción 18). En este caso, la oxidación del sustrato tiene lugar mediante la reacción con $\text{O}_2^{\bullet-}$, al igual que ocurría en las Reacciones 9 y 10 del mecanismo Tipo I. Sin embargo, según la clasificación propuesta por Foote (Esquema 3), el mecanismo permanece dentro de la categoría Tipo II debido a que el fotosensibilizador en estado excitado reacciona directamente con el O_2 .



2. DAÑOS EN EL ADN POR LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA

La radiación ultravioleta es un agente físico capaz de causar mutaciones en diversos organismos, las cuales están ligadas a procesos de fotocarcinogénesis. En este capítulo se describirán las características de la radiación solar, especialmente de la radiación UV-Visible, y se expondrán algunos de los procesos desencadenados por este tipo de radiación. Se detallará la composición química de una de las biomoléculas más relevantes de los sistemas biológicos, el ácido desoxirribonucleico, y se describirán las principales reacciones en las que participa esta macromolécula cuando es expuesta a radiación UV.

2.1. EL ADN Y SUS COMPONENTES

El ácido desoxirribonucleico (ADN) es una de las biomoléculas más importantes de los seres vivos ya que es la encargada de almacenar la información genética. Desde el punto de vista químico, el ADN es un polímero cuyos monómeros son los nucleótidos. En este apartado se describirá la estructura y algunas de las propiedades más relevantes de los constituyentes y la macromolécula.

2.1.1. Estructura química y propiedades de los nucleótidos

Los nucleótidos son moléculas orgánicas que participan en diversas funciones del metabolismo celular. Son ricas en energía, dirigen procesos metabólicos de las células, actúan como señales químicas y son componentes estructurales de ciertas enzimas e intermediarios metabólicos.

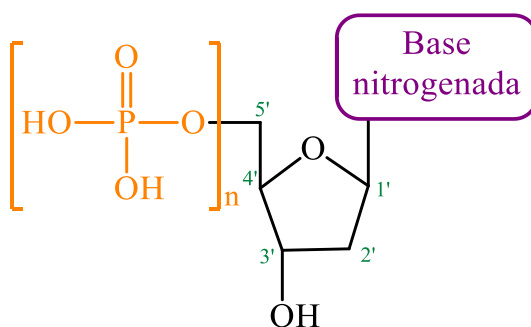


Figura 3. Estructura química de un desoxirribonucleótido.

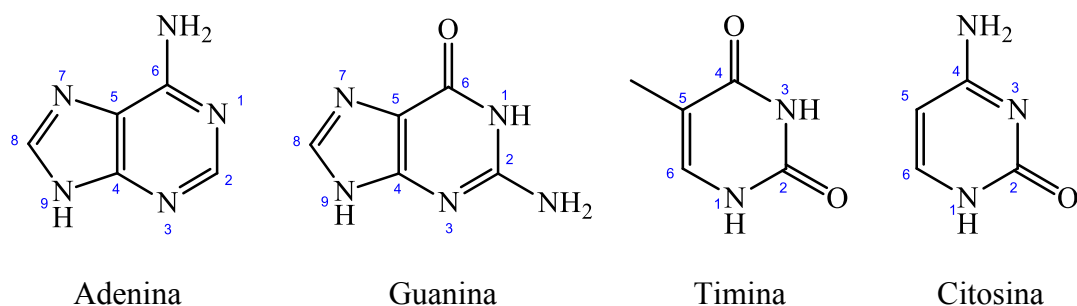


Figura 4. Estructuras químicas de las bases púricas y pirimídicas que forman parte de los nucleótidos.

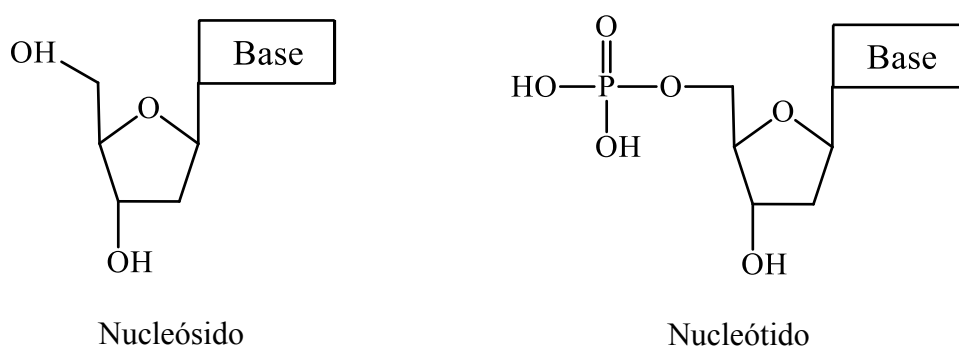


Figura 5. Estructura química de los nucleósidos y nucleótidos.

Base	Nucleósido (dN)	Nucleótido (dNMP)
Adenina (Ade)	2'-desoxiadenosina (adenosina, dA)	2'-desoxiadenosina-5'-monofosfato (dAMP)
Guanina (Gua)	2'-desoxiguanosina (guanosina, dG)	2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato (dGMP)
Timina (Thy)	2'-desoxitimidina (timidina, dT)	2'-desoxitimidina-5'-monofosfato (dTMP)
Citosina (Cyt)	2'-desoxicitidina (citidina, dC)	2'-desoxicitidina-5'-monofosfato (dCMP)

Tabla 1. Nomenclatura de los constituyentes del ADN.

Los nucleótidos están formados por una base nitrogenada, un monosacárido de cinco átomos de carbono y uno o más grupos fosfato (Figura 3). Se distingue entre ribonucleótido o desoxirribonucleótido en función de si el monosacárido es una ribosa o una 2'-desoxirribosa, respectivamente. El prefijo desoxi- hace referencia a que el azúcar carece de un átomo de oxígeno con respecto a la ribosa.

La base nitrogenada puede ser una purina (adenina y guanina) o una pirimidina (timina y citosina) (Figura 4).

En un desoxirribonucleótido, el átomo de carbono de la posición 1' (Figura 3) se une al nitrógeno 1 de las bases pirimidínicas o al 9 de las púricas (Figura 4) a través de un enlace N-glicosídico. El signo prima (') se utiliza para diferenciar las posiciones del azúcar de las de la base. La posición más frecuente de la unión éster en los nucleótidos es el hidroxilo del carbono 5' del azúcar. Al derivado del nucleótido que no tiene el grupo fosfato se lo denomina nucleósido (Figura 5). En la Tabla 1 se resume la nomenclatura y las abreviaturas de las bases, los nucleósidos y los nucleótidos.

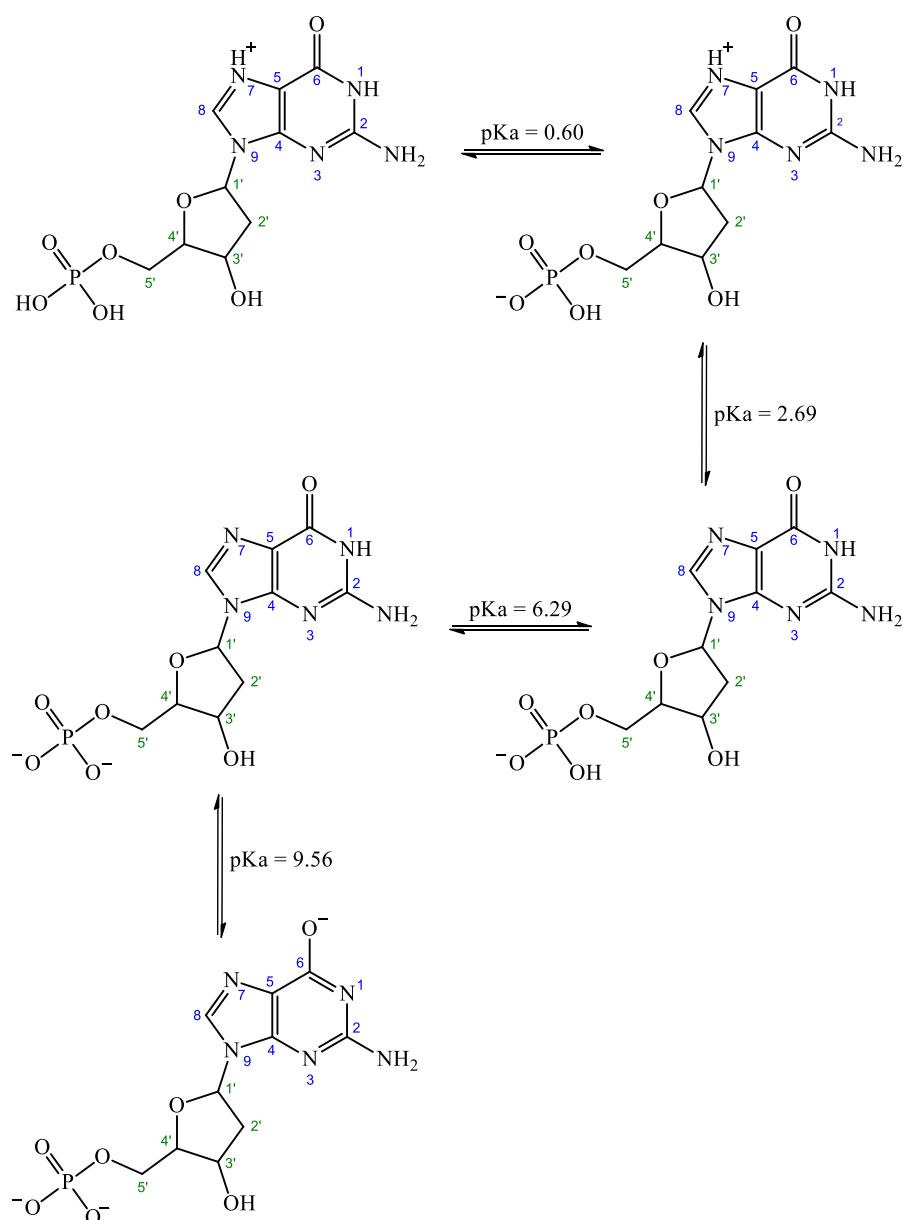


Figura 6. Equilibrios ácido-base de dGMP en disolución acuosa en el rango de pH comprendido entre 0 y 14.

Los nucleótidos poseen varios grupos ionizables en medio acuoso, tanto en el grupo fosfato como en la base nitrogenada. Luego, la carga neta de la molécula dependerá del valor de pH del medio. La pérdida del primer protón, perteneciente al grupo fosfato, ocurre a pH inferior de 1 para los nucleótidos púricos y a pH entre 1 y 2 para los pirimidínicos. Por ende, este equilibrio no es importante desde el punto de vista biológico. Cuando la base es Gua, hay equilibrios ácido-base que involucran a la purina (Figura 6). Con Ade, sólo tiene lugar la protonación de la base en el nitrógeno 1. Thy pierde un protón del nitrógeno 3 a pH alcalino. La pérdida del segundo protón del grupo fosfato tiene lugar a valores de pH por encima de 9. Finalmente, el azúcar de los nucleósidos se puede desprotonar a pH superior a 12, y por lo tanto, tampoco es relevante a pH fisiológico.

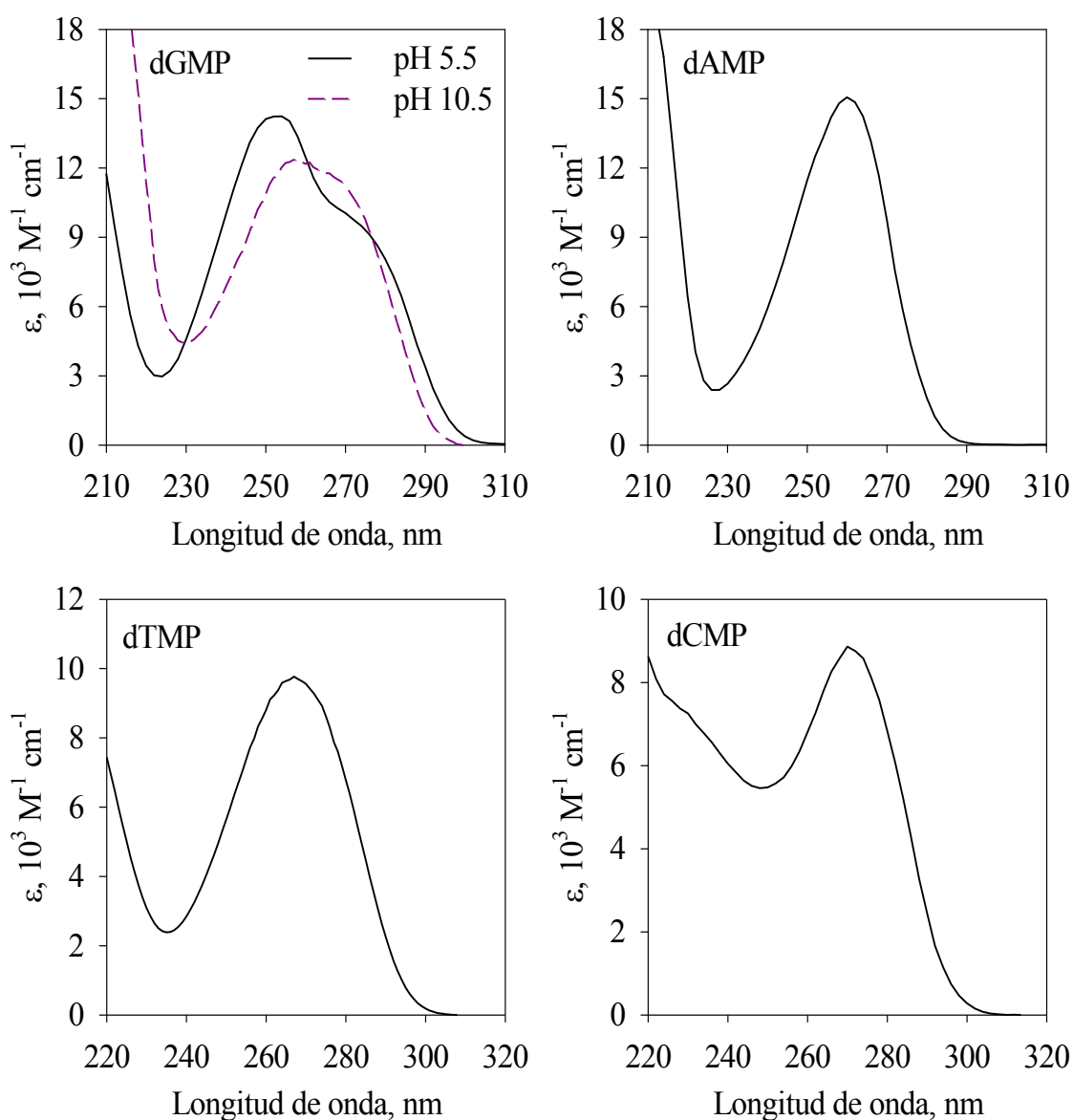


Figura 7. Espectros de absorción de los nucleótidos en disolución acuosa a pH 7. Para dGMP se registraron a pH 5.5 y 10.5.

En la **Figura 7** se muestran los espectros de absorción de los cuatro nucleótidos (dGMP, dAMP, dTMP y dCMP) en disolución acuosa. Evidentemente, los espectros de absorción no se ven afectados por los equilibrios ácido-base que involucran al grupo fosfato. Sin embargo, cuando se ioniza el cromóforo de la molécula (base nitrogenada), el espectro cambia considerablemente. Los experimentos de esta tesis doctoral se realizaron a valores de pH cercanos al fisiológico.

2.1.2. El ácido desoxirribonucleico

El ADN contiene toda la información genética de los seres vivos. Por ejemplo, la estructura de las proteínas de una célula es fruto de la información contenida en la secuencia de nucleótidos del ADN (los genes) [Nelson, 2002].

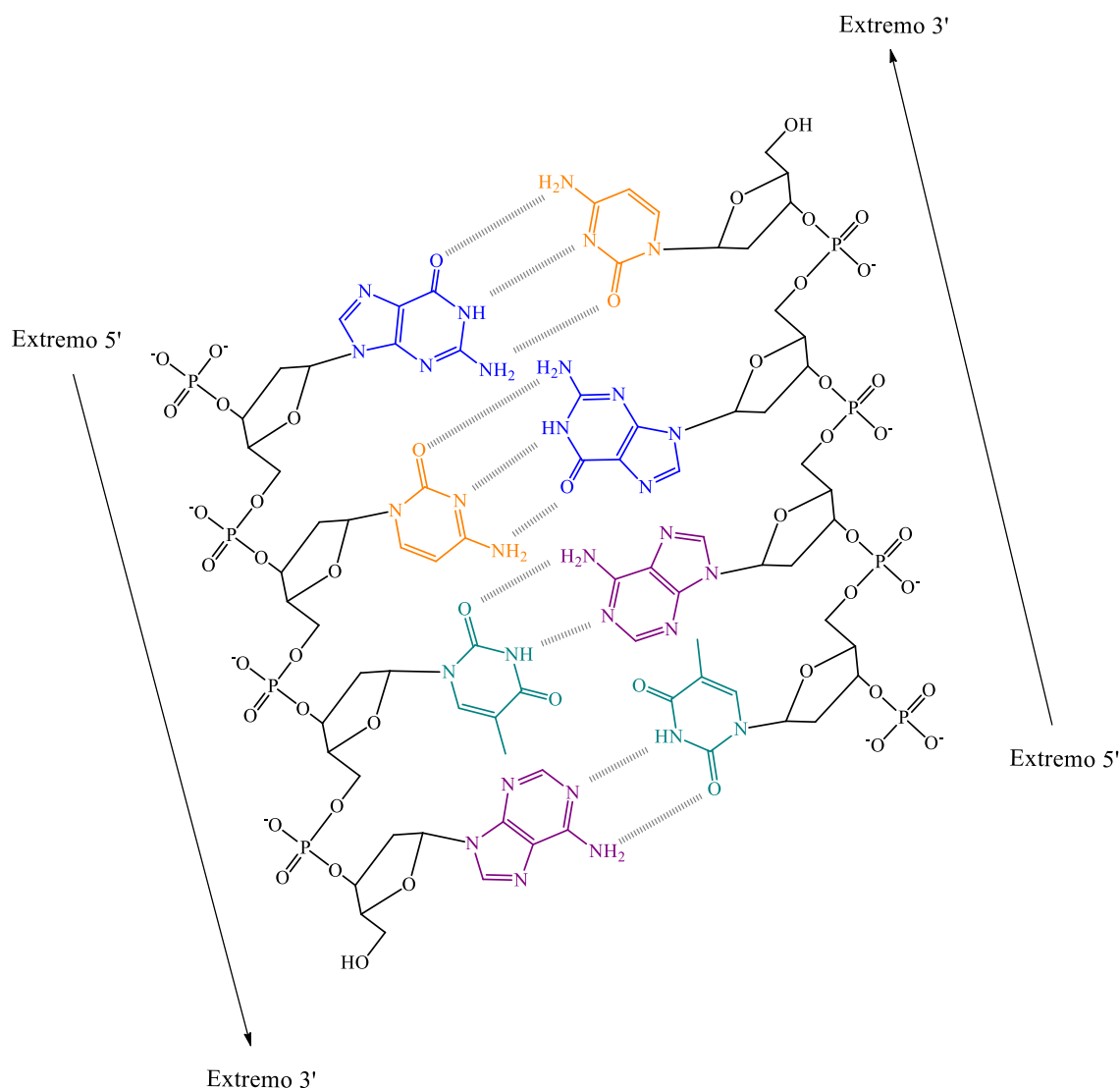


Figura 8. Estructura de la doble hélice del ADN.

La estructura del ADN fue propuesta por Watson y Crick en 1953 [Watson, 1953] basándose en los datos de difracción de rayos X obtenidos por Wilkins y Franklin. La macromolécula está formada por dos cadenas helicoidales de nucleótidos con giro a la derecha creando una doble hélice alrededor de un eje central. Los nucleótidos se enlazan sucesivamente a través de los grupos fosfato. La unión se da entre el grupo hidroxilo del carbono 3' y el grupo fosfato unido al carbono 5' del siguiente nucleótido mediante un enlace fosfodiéster. La cadena lineal de ADN tiene una polaridad específica, por lo que se pueden definir los extremos 5' y 3'. Esta numeración está referida a la ribosa, ya que en el extremo 5' de la secuencia hay un grupo fosfato libre unido al carbono 5' y en el extremo 3' hay un grupo hidroxilo unido al carbono 3' de la ribosa. Las cadenas de ADN son esqueletos de ácidos nucleicos donde quedan alternados los grupos fosfatos y los residuos de pentosa, mientras que las bases quedan como grupos laterales. Ambas cadenas se asocian por puentes de hidrógeno establecidos entre pares de bases. La única posibilidad de unión entre pares de bases es Gua con Cyt y Ade con Thy, formándose a razón de dos o tres puentes de hidrógeno respectivamente (Figura 8).

2.2. DISTRIBUCIÓN DE LA RADIACIÓN SOLAR EN LA TIERRA

El Sol es la principal fuente de energía para todos los procesos de la Tierra, ya que más del 99 % de la energía que recibe el planeta proviene de dicha estrella. La radiación electromagnética procedente del Sol puede provocar efectos beneficiosos en los seres vivos (fotosíntesis, síntesis de vitamina D), pero también puede ocasionar efectos perjudiciales para la salud (quemaduras, fotoalergias, fotoenvejecimiento o cáncer de piel). La radiación solar abarca desde el infrarrojo hasta el ultravioleta, pero sólo una pequeña porción de esta radiación emitida alcanza la superficie de la tierra. Esto se debe a que los gases presentes en la atmósfera son capaces de absorber gran parte de esta radiación.

La distribución de la radiación solar sobre la superficie terrestre depende de la época del año (posición respecto al Sol), composición de la atmósfera (aerosoles, ozono, nubosidad), posición geográfica (latitud, longitud y altura sobre el nivel del mar), del tipo de suelo (nieve, arena, césped, asfalto), etc. Por lo tanto, no se distribuye de manera homogénea y varía en cada punto del planeta. A modo de ejemplo, la Figura 9 muestra la irradiancia solar registrada en la ciudad de La Plata (Buenos Aires, Argentina) en el mes de octubre a mediodía con un cielo despejado. Aproximadamente el 40 % de la energía solar que alcanza la superficie terrestre pertenece a radiación infrarroja, el 50 % a radiación visible (400 – 700 nm) y el 10 % a radiación UV (200 – 400 nm). La radiación UV es la más nociva para los sistemas biológicos, a pesar de ser la minoritaria, debido a que es la más energética.

La radiación UV se divide en tres regiones. La radiación UV-C abarca las longitudes de onda que van desde los 200 hasta los 280 nm aproximadamente.

Esta región del espectro no alcanza la superficie terrestre porque es filtrada por el ozono presente en la atmósfera [Gasparro, 1997]. Entre los 280 y los 320 nm se encuentra la región UV-B, que en gran parte es filtrada por el ozono de la atmósfera. La longitud de onda más corta detectable al nivel del mar está alrededor de los 290 nm. Sin embargo, este punto de corte se encuentra influenciado por la concentración de ozono atmosférico y la disminución de la capa del mismo permite el ingreso de radiación de mayor energía. Finalmente, la región comprendida entre los 320 y los 400 nm es la radiación UV-A, que atraviesa fácilmente las nubes y constituye la mayor parte de la radiación ultravioleta que alcanza la superficie terrestre.

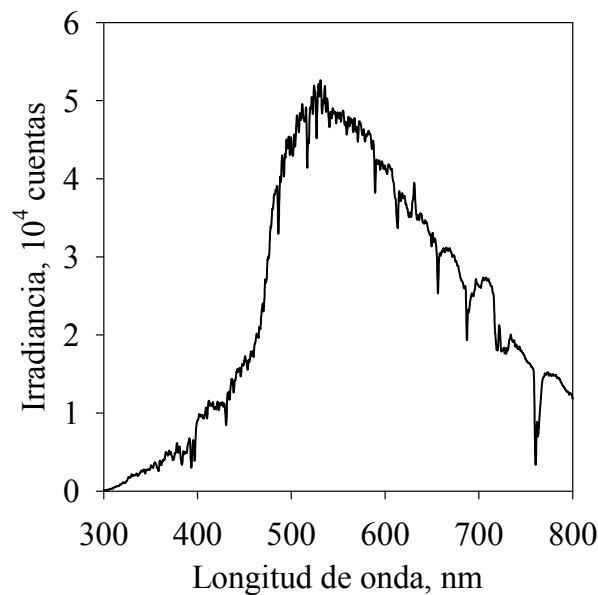


Figura 9. Irradiancia solar espectral en función de la longitud de onda. Registrado el 8 de octubre con cielo despejado en la ciudad de La Plata, Argentina [Serrano, 2014].

2.3. EFECTOS BIOLÓGICOS DE LA RADIACIÓN UV EN EL ADN

La radiación electromagnética ocasiona modificaciones químicas en la biomolécula de ADN a través de diversos mecanismos, lo que puede originar alteraciones a nivel celular [Ravanat, 2001]. Si el daño en el material genético de una célula es significativo y no puede ser revertido por los mecanismos de reparación celular, dicha célula muere. La muerte celular se puede producir por apoptosis o necrosis. El primero es un mecanismo programado que evita el derrame del contenido celular, y por lo tanto, no daña el entorno. Sin embargo, la necrosis es la muerte patológica de una célula o tejido. Si el daño en el material genético no es suficiente como para provocar la muerte, las consecuencias para la célula dependerán del tipo y magnitud de las lesiones.

Antes de que se produzca la división celular, el material genético debe duplicarse. Si el ADN utilizado como molde posee alguna base modificada químicamente (por ejemplo, por exposición a radiación UV) es probable que se

genere una mutación durante la replicación del ADN, a pesar de los múltiples sistemas de reparación que poseen las células. Una mutación es un cambio permanente en la secuencia de bases. La modificación se puede dar debido a la sustitución de un par de bases por otro (mutación por sustitución) o por la adición o la eliminación de uno o más pares de bases (mutaciones de inserción o deleción). Las mutaciones pueden tener un efecto insignificante en la función de un gen (silenciosas), otorgar alguna ventaja a la célula o ser nocivas. Las que confieren alguna ventaja a la célula no son comunes, pero su frecuencia es suficiente para conferir la variación necesaria hacia la selección natural y, por lo tanto, la evolución. No obstante, la mayoría de las mutaciones son desfavorables para las células [Nelson, 2002].

La radiación UV produce mutaciones en los mamíferos, y como consecuencia genera procesos neoplásicos. La carcinogénesis por radiación UV a menudo involucra la inactivación de un gen supresor de tumores (como el gen p53) o la sobreexpresión de protooncogenes (entre ellos, el gen ras). La función del p53 es proteger a la célula del estrés provocado por la irradiación UV u otros factores, o producir la apoptosis cuando el daño sobre el ADN es severo. Recientemente, se han detectado formas mutantes de los oncogenes ras y del gen p53, tanto en cánceres de piel en humanos en zonas previamente expuestas a radiación solar, como en cánceres inducidos por UV-B en ratones [Daya-Grosjean, 2005].

Los mecanismos de reparación de las modificaciones producidas en el ADN son más eficientes frente a lesiones originadas por radiación UV-B que UV-A [Mouret, 2006]. En respuesta a la exposición solar, la piel se pigmenta (se broncea) e incrementa su espesor. Estos mecanismos le confieren a la piel cierta protección frente a futuras exposiciones a la radiación UV [Matsumura, 2004]. Debido a esto, las personas de piel muy clara que no se broncean apreciablemente, presentan mayor riesgo de desarrollar cáncer de piel. En el ser humano, los efectos biológicos provocados por la exposición solar están determinados por la naturaleza física de los fotones solares incidentes y la estructura química de los cromóforos presentes en la piel [Wondrak, 2006].

2.4. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA RADIACIÓN ELECTROMAGNÉTICA EN EL ADN

Se han realizado numerosos estudios sobre la dependencia de los efectos derivados del daño al ADN en función de la longitud de onda de la radiación incidente. Algunos estudios con animales de laboratorio muestran que el cáncer de piel se produce de forma más efectiva con radiación UV-B que con UV-A [Coohill, 1987]. Sin embargo, en las últimas décadas se ha demostrado que la radiación UV-A también es mutagénica y carcinogénica [Hiraku, 2007].

Coohill y su grupo de investigación determinaron los espectros de acción, es decir, curvas de diferentes respuestas celulares inducidas por la radiación

incidente en función de la longitud de onda, para evaluar el efecto producido por las distintas longitudes de onda sobre el ADN. Se analizó la capacidad de inducir mutaciones, muerte celular, cortes en el ADN y entrecruzamiento (*crosslinking*) de ADN con proteínas en células humanas P3. En la **Figura 10** se aprecia que el espectro de acción para inducción de mutación y tumorigénesis no coincide con el espectro de ADN en la región UV-A. Esto se observó en estudios similares realizados sobre otros sistemas biológicos [Coohill, 1987].

La radiación absorbida por las bases nitrogenadas del ADN, hasta 320 nm aproximadamente (**Apartado 2.1.1**), produce la respuesta máxima comparada con otras longitudes de onda (**Figura 10**). Además, los máximos de los espectros de acción se corresponden bastante bien con el máximo del espectro de absorción del ADN. Por consiguiente, el efecto de la radiación UV-B y UV-C se explica fácilmente teniendo en cuenta que el ADN absorbe este tipo de radiación y, consecuentemente, sufre daño directo. Sin embargo, por encima de los 320 nm (radiación UV-A y visible) se produjeron las mismas respuestas, aunque con menor eficiencia. Además, se observan máximos secundarios en la región UV-A para mutagenicidad y ruptura del ADN.

Del análisis de estos experimentos se deduce que el ADN puede ser dañado por dos tipos de mecanismos. Por un lado, la absorción de radiación UV-B y UV-C por las bases genera estados excitados que vuelven reactiva a la biomolécula de ADN, produciendo su modificación o alteración química (daño directo). Por otro lado, la absorción de radiación UV-A y visible por parte de otro cromóforo genera especies químicas que reaccionan con el ADN (daño indirecto por procesos fotosensibilizados).

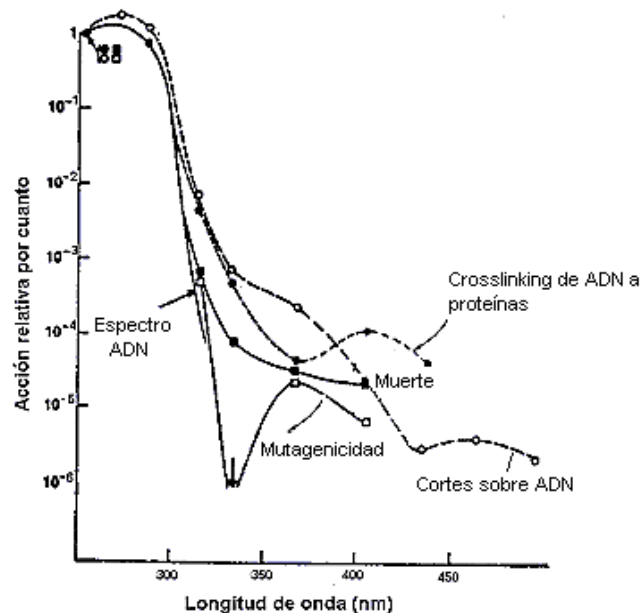


Figura 10. Espectros de acción para letalidad, mutagenicidad y otros espectros de la radiación sobre células. Con fines comparativos todos los espectros se normalizaron a 254 nm y se agregó el espectro de absorción del ADN [Coohill, 1987].

2.4.1. Daño directo al ADN

Los estados excitados generados por absorción directa de radiación producen distintos tipos de reacciones, siendo las más comunes las que involucran a bases pirimidínicas. Las bases púricas también sufren reacciones fotoquímicas cuando absorben radiación, pero en menor medida [Ravanat, 2001]. Los principales fotoproductos generados en el ADN por radiación UV-B son los dímeros ciclobutil pirimidina (CPD) y los aductos pirimidina (6,4) pirimidona o, simplemente, 6,4-fotoproductos. Los CPD son los más abundantes y se forman por una cicloadición [2+2] del doble enlace existente entre los carbonos 5 y 6 de bases de pirimidina adyacentes (Figura 11).

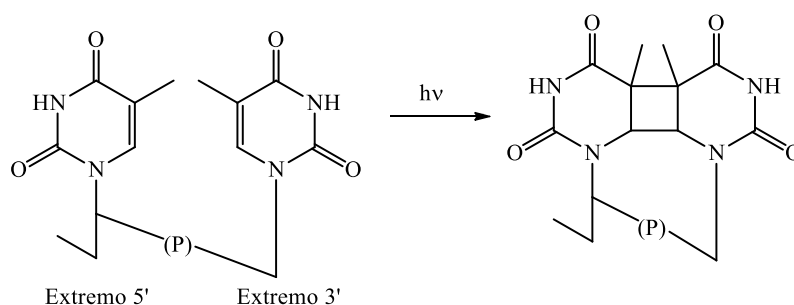


Figura 11. Formación de dímeros de Thy ciclobutano (Thy<=>Thy).

Pueden formarse dímeros Thy<=>Thy, Cyt<=>Thy, Thy<=>Cyt y Cyt<=>Cyt. Si la radiación incidente es de tipo UV-C, el daño puede revertirse por un proceso de monomerización, ya que los dímeros absorben en esa región del espectro electromagnético. También pueden sufrir procesos de deaminación, generando así un nuevo producto. Se cree que la formación de CPD tiene lugar por la fotoexcitación de una pirimidina a un estado excitado singlete, y que tras la formación del triplete por un cruce de sistemas, reacciona con una segunda molécula adyacente en estado fundamental [Cadet, 1992]. Por otra parte, la formación de 6,4-fotoproductos involucra reacciones de estados excitados singletes, y a diferencia de los CDP, el proceso no es reversible. Estos fotoproductos se generan con una cicloadición [2+2] entre los dobles enlaces de los carbonos 5 y 6 de la pirimidina 5' terminal y del grupo carbonilo del carbono 4 de Thy 3' terminal, dando lugar a un oxetano inestable (Figura 12). Si la base 3' es Cyt, se genera un intermediario azetidina a través de una cicloadición de la función 4-imino de la última base de pirimidina. El oxetano o la azetidina pueden evolucionar espontáneamente dando lugar a los 6,4-fotoproductos. Estos aductos absorben aproximadamente a 320 nm, y bajo irradiación UV-B fotoisomerizan generando un isómero de valencia Dewar (Figura 12) [Ravanat, 2001].

Las bases púricas también pueden generar dímeros por absorción de radiación UV-B, por ejemplo, dímeros de Ade [Kumar, 1987] y aductos Ade-Thy [Koning,

1990]. Por otro lado, la oxidación de Gua por exposición de ADN aislado a radiación UV-B o UV-C también es posible [Wei, 1997].

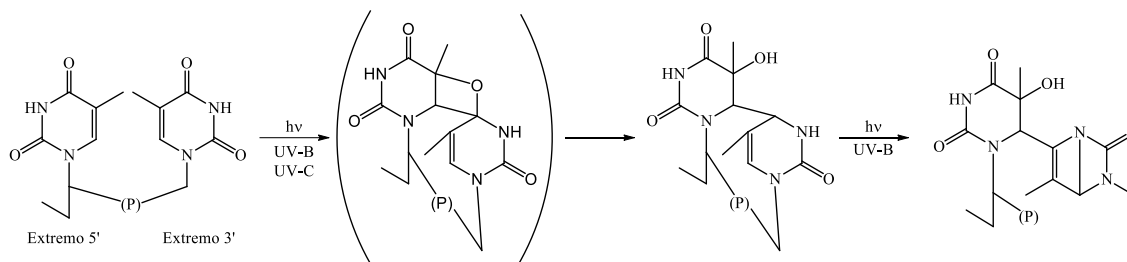


Figura 12. Formación y fotoisomerización del 6,4-fotoproducto de Thy.

Las células tienen dos mecanismos principales para eliminar los dímeros que se producen en el ADN. Uno de ellos consiste en la acción de un conjunto de enzimas que efectúan la denominada "reparación por corte de nucleótido". Estas enzimas cortan la cadena dañada en la zona donde se encuentran los dímeros de pirimidina, sacan los nucleótidos modificados y sintetizan una cadena nueva. El otro mecanismo se denomina fotorreactivación [Sancar, 2003], y es realizado por un tipo de enzimas denominadas fotoliasas. Se conocen dos clases de fotoliasas, unas reparan dímeros de pirimidina y otras los 6,4-fotoproductos. Las fotoliasas son activadas por la luz azul (350 – 450 nm), ya que es absorbida por sus cromóforos. Contienen dos cromóforos, uno es siempre flavina adenina dinucleótido (FAD) y el otro puede ser un derivado pterínico (meteniltetrahidrofolato o MTHF) o una deazarriboflavina [Sancar, 2003].

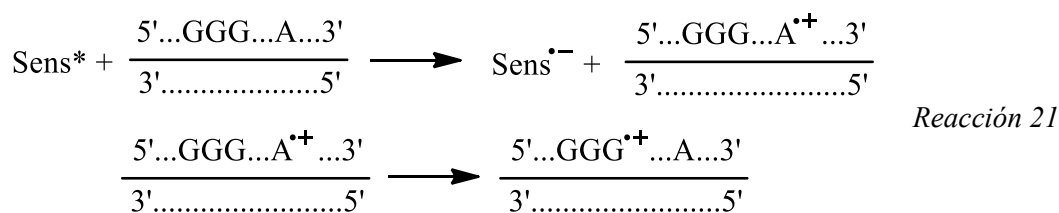
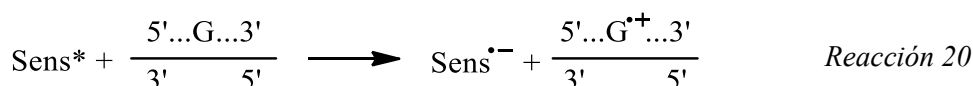
2.4.2. Daño al ADN por procesos fotosensibilizados

2.4.2.1. Transferencia de energía de un sensibilizador al ADN

La radiación UV-A también induce la formación de CPD en el ADN, aunque en menor medida que la UV-B y a través de un mecanismo diferente. La fotoexcitación con radiación UV-A de un sensibilizador apropiado, como benzofenona, puede originar CPD tras la formación de estados excitados capaces de participar en reacciones de transferencia de energía triplete-triplete con determinadas bases del ADN [Delatour, 1998]. El fotosensibilizador debe colocarse suficientemente cerca del ADN para que pueda tener lugar la transferencia de energía. El daño fotoinducido en bacterias y células eucariotas de piel por radiación UV-A, sin el agregado de fotosensibilizadores exógenos, genera CPD como productos mayoritarios [Wondrak, 2006; Mouret, 2006]. Sin embargo, en experimentos realizados con levaduras se descubrió que el mecanismo de transferencia de energía no es el principal y se encontró una mayor proporción de productos de fotooxidación (ver más adelante). Estos resultados indican que el tipo de célula y su entorno juegan un papel muy importante en el tipo de proceso fotoinducido que afecta al ADN.

2.4.2.2. Oxidaciones fotosensibilizadas mediante mecanismo Tipo I

Gua es la base que posee el menor potencial de oxidación, por lo que en un mecanismo de transferencia electrónica, es la más reactiva en comparación con las otras tres [Ravanat, 2001; Steenken, 1989; Steenken, 1997]. La formación del radical catión de guanosa ($\text{dGuo}^{\bullet+}$) en el ADN en presencia de un fotosensibilizador Tipo I, se puede originar por la abstracción de un electrón de un residuo Gua o mediante una transferencia de huecos (*hole transfer*) desde otra base relativamente lejana (Reacciones 19, 20 y 21). La transferencia de huecos ocurre a través del ADN de doble cadena, principalmente desde radicales cationes Ade hacia Gua [Giese, 2000; Schuster, 2000; Wan, 2000]. Por consiguiente, se produce más cantidad de $\text{dGuo}^{\bullet+}$ por la transferencia de huecos que por la transferencia de un electrón al sensibilizador, y además, este radical es mayoritario frente a los originados en otras bases.



Los principales productos generados a partir del radical $\text{dGuo}^{\bullet+}$ son 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina (FapydGuo), 8-oxo-7,8-dihidro 2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo), 2-amino-5-[2-desoxi-b-D-eritro-pentofuranosil] amino]-4H-imidazol-4-ona (imidazolona, dIz) y 2,2-diamino-5-[2-desoxi-b-D-eritro-pentofuranosil]amino]-5(2H)-oxazolona (oxazolona, dZ) (Figura 13) [Serrano, 2015; Misiaszek, 2004]. La distribución de estos productos varía en función del sustrato utilizado (base libre o fragmento de ADN de doble cadena) [Cadet, 2003].

A pesar de que el potencial de ionización de Ade es mayor que el de Gua, también se puede oxidar a través de un mecanismo Tipo I. En disoluciones acuosas aireadas, el radical catión de adenosina ($\text{dAdo}^{\bullet+}$) es desprotonado en el grupo amino exocíclico formando el radical neutro de adenosina ($\text{dAdo}(-\text{H})^{\bullet}$) [Shi, 2000]. La hidratación de $\text{dAdo}^{\bullet+}$ también tiene lugar, aunque en menor medida, produciendo el radical 8-hidroxi-7,8-dihidro 2'-desoxiadenosil. Este radical genera 4,6-diamino 5-formamidopirimidina (FapydAdo) bajo condiciones reductoras y 8-oxo-7,8-dihidro 2'-desoxiadenosina (8-oxodAdo) en presencia de O_2 [Ravanat, 2001; Cadet, 2013].

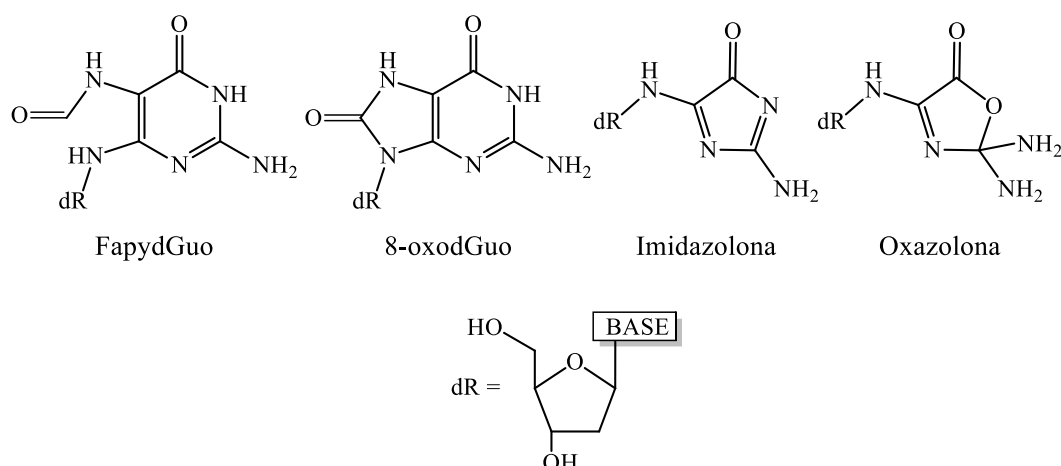


Figura 13. Productos de degradación de guanosina en ADN mediante un mecanismo Tipo I.

Las bases pirimídicas son mucho menos susceptibles a la oxidación que las púricas. Sin embargo, se ha estudiado la oxidación de Thy a través de un mecanismo Tipo I con diferentes fotosensibilizadores [Decarroz, 1986; Delatour, 1998; Serrano, 2016]. La formación de los productos se puede explicar con las reacciones de desprotonación o hidratación que sufre el radical catión de Thy [Wagner, 1994; Cadet, 2014 (a); Cadet, 2014 (b)]. Los productos formados por la vía de desprotonación son 5-hidroximetil-2'-uridina 5'-monofosfato (5-HmdUMP) y 5-formil-2'-desoxiuridina 5'-monofosfato (5-FordUMP) [Von Sonntag, 1991; Von Sonntag, 1997], mientras que los obtenidos por la hidratación del radical son 1-(2-desoxi-beta-D-eritro-pentofuranosil-5-fosfato)-5-hidroxi-5-metilhidantoína (5-HO-5MHMP) y timina glicol 5'-monofosfato (dTMPGly) [Decarroz, 1986, Wagner, 1994, Ravanat, 2001].

2.4.2.3. Oxidaciones fotosensibilizadas mediante mecanismo Tipo II

En las reacciones que tienen lugar a través de un mecanismo Tipo II, hay una interacción directa entre el estado excitado del fotosensibilizador y el O_2 (Apartado 1.4.2), generando $O_2^{\bullet-}$ por transferencia electrónica u 1O_2 por transferencia de energía, siendo esta última la más importante en los sistemas biológicos.

La base Gua es el único componente del ADN que reacciona significativamente con 1O_2 a pH neutro [Cadet, 1978]. Se cree que la oxidación de Gua por 1O_2 involucra la formación de un endoperóxido inestable como resultado de una cicloadición [4+2] Diels Alder [Sheu, 1993]. Inicialmente, se consideró a los dos diastereoisómeros (4R* y 4S*) de 4-hidroxi-8-oxo-4,8-dihidro 2'-desoxiguanosina (8-oxodG) como los productos estables de la descomposición del endoperóxido [Ravanat, 1995]. Posteriormente, se demostró que los diastereoisómeros se reordenan para dar espiroiminodihidantoína (Sp) [Luo, 2000]. Sin embargo, en la reacción del 1O_2 con ADN de doble cadena no se

detectaron esos productos, siendo 8-oxodG el principal fotoproducto. La formación de 8-oxodG se debería a un reordenamiento del 4,8-endoperóxido para formar 8-hidroperoxil-2'-desoxiguanosina, seguido de una reducción (Figura 14).

La 8-oxodG tiene una constante de reacción con $^1\text{O}_2$ dos órdenes de magnitud mayor que dG [Cadet, 1995], por lo que es un excelente sustrato para reacciones de fotooxidación Tipo II. El producto obtenido es la dihidroguanidinohidantoína (Figura 15) [Henderson, 2003].

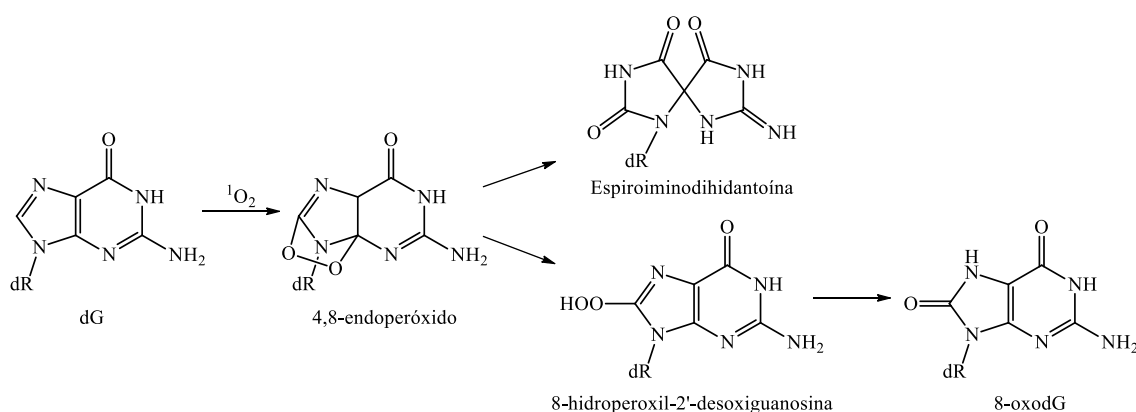


Figura 14. Productos de degradación de dG por un mecanismo Tipo II, siendo dR = desoxirribosa.

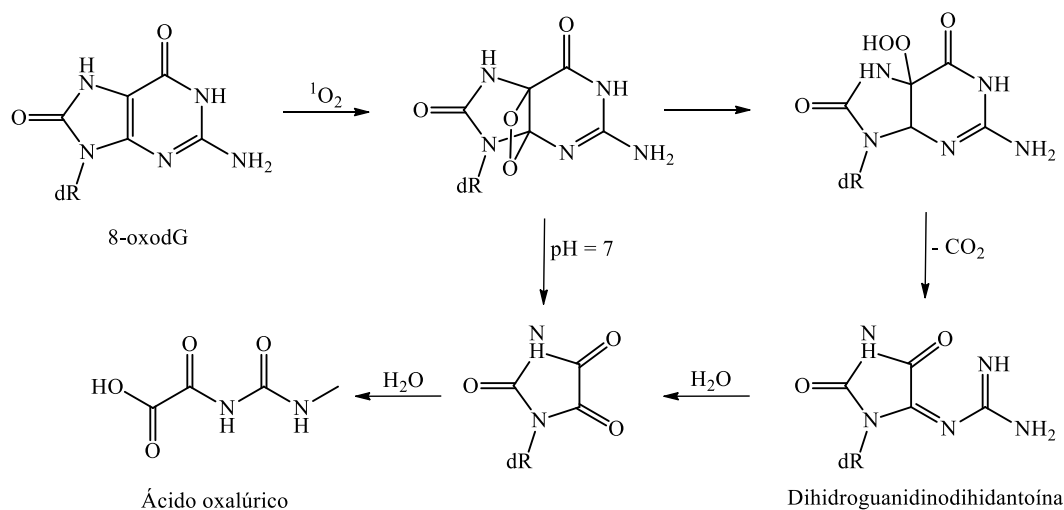


Figura 15. Productos de degradación de 8-oxodG mediante un mecanismo Tipo II, siendo dR = desoxirribosa.

3. PROPIEDADES QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS DE LAS PTERINAS

Las pteridinas son una familia de compuestos orgánicos heterocíclicos presentes en la naturaleza. Se encuentran en pequeñas cantidades en los seres vivos y desempeñan diversas funciones en los mamíferos. Los primeros trabajos científicos relacionados con estos compuestos se llevaron a cabo en 1889, donde se trataron de aislar algunos pigmentos de distintos tipos de mariposas [Hopkins, 1889; Hopkins, 1895; Hopkins, 1942]. Más tarde, se dilucidó la estructura molecular de estos pigmentos naturales, planteándose como derivados del heterociclo pirazina [2,3-d] pirimidina [Purmann, 1940; Purmann, 1941], que finalmente, se denominó pteridina [Schöpf, 1941].

3.1. ESTRUCTURA QUÍMICA

Desde el punto de vista estructural, las pteridinas son moléculas con un doble anillo de diez átomos, cuatro de los cuales son átomos de nitrógeno. Por lo tanto, se pueden definir como tetra-azo-naftalenos. La estructura heterocíclica general de las pteridinas con su correspondiente numeración aparece en la [Figura 16](#). El anillo I hace referencia a la estructura de la pirimidina, mientras que el anillo II corresponde a la pirazina. Además, en la [Figura 16](#) se muestran las dos estructuras químicas de las que se derivan las “pteridinas naturales” presentes en los seres vivos: 2-aminopteridin-4(3H)-ona o pterina (Ptr) y pteridin-2,4(1H,3H)-diona o lumazina (Lum).

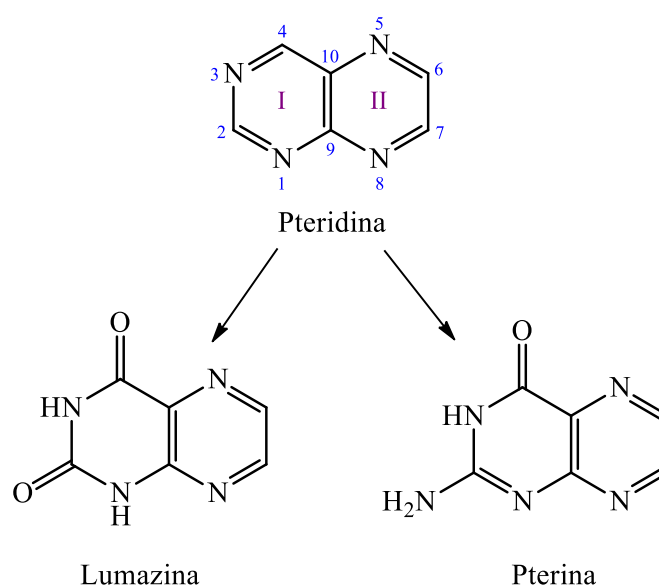


Figura 16. Estructura química básica de las pteridinas. Anillo de pirimidina (I) y pirazina (II). Estructura química de pteridinas naturales: lumazinas y pterinas.

Los derivados pterínicos normalmente se encuentran sustituidos en la posición 6 del anillo pirazina. En la [Tabla 2](#) se resumen los sustituyentes de los derivados pterínicos más importantes desde el punto de vista biológico. En función de la estructura del sustituyente, se pueden clasificar en dos grupos:

- ✚ Pterinas no conjugadas, cuyos sustituyentes poseen una cadena corta hidrocarbonada o un único átomo de carbono.
- ✚ Pterinas conjugadas, cuyos sustituyentes son de mayor peso molecular e incluyen una molécula de ácido para-aminobenzóico (PABA). Un ejemplo es el ácido fólico (PteGlu), que además de PABA posee una o varias moléculas de ácido glutámico enlazadas mediante una unión peptídica.

Las pterinas se pueden encontrar en diferentes estados de oxidación en la naturaleza, donde el anillo pirazina es el que se encuentra parcial o completamente reducido. Las pterinas reducidas más comunes presentes en sistemas biológicos son las 7,8-dihidropterinas y las 5,6,7,8-tetrahidropterinas ([Figura 17](#)).

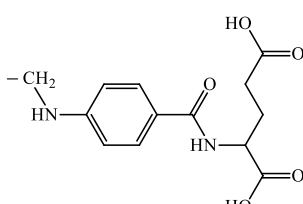
-R	Compuesto
-H	Pterina (Ptr)
-CH ₃	6-metilpterina (Mep)
-CHO	6-formilpterina (Fop)
-COOH	6-carboxipterina (Cap)
-CHOH-CHOH-CH ₃	Biopterina (Bip)
-CHOH-CHOH-CH ₂ OH	Neopterina (Nep)
	Ácido fólico (PteGlu)

Tabla 2. Estructura y nomenclatura de algunas pterinas oxidadas.

3.2. PROPIEDADES ÁCIDO-BASE Y EQUILIBRIO TAUTOMÉRICO

En la [Figura 18](#) aparece representado el equilibrio ácido-base más importante de las pterinas en disolución acuosa, si se consideran los valores de pH presentes en los sistemas biológicos. La forma ácida de este equilibrio (amida) corresponde a la forma neutra, mientras que la forma alcalina (fenolato) posee una carga

negativa. Este equilibrio se ha estudiado en disolución acuosa y se han reportado valores de pK_a cercanos a 8 para las pterinas oxidadas [Albert, 1953; Monópoli, 2000; Thomas, 1996; Lorente, 2004; Thomas, 2000] y próximos a 10 para las dihidropterinas [Pfleiderer, 1978; Pfleiderer, 1987; Maharaj, 1990; Dántola, 2008]. Este comportamiento se ve afectado por la presencia de sustituyentes adicionales en el doble anillo pterínico, los cuales pueden modificar los valores de pK_a y la carga neta de la molécula. Durante el desarrollo de esta tesis se trabajó con Ptr, que es el compuesto modelo no sustituido de las pterinas oxidadas y cuyo pK_a es 7.9 [Monópoli, 2000].

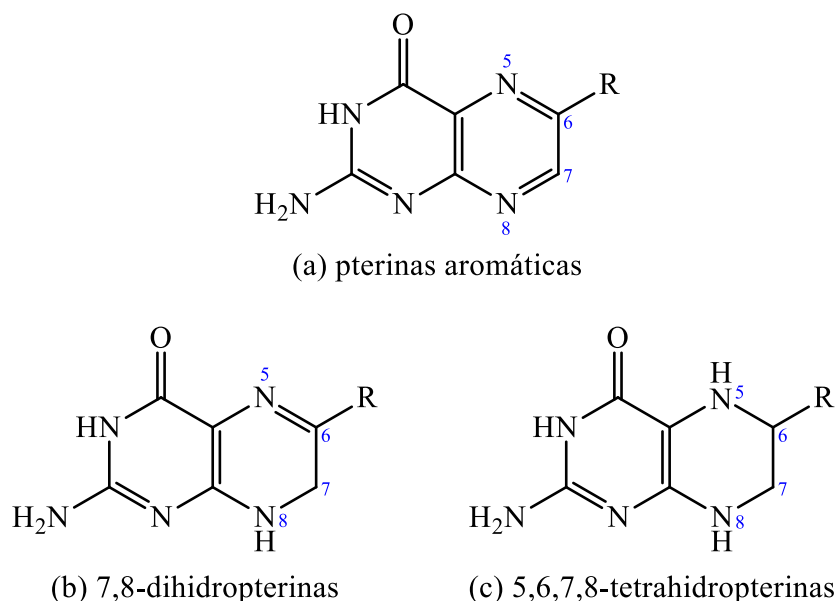


Figura 17. Estructura química general de las pterinas aromáticas, 7,8-dihidropterinas y 5,6,7,8-tetrahidropterinas.

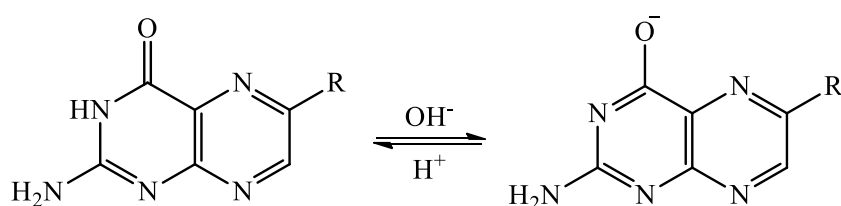


Figura 18. Equilibrio ácido-base de pterinas en disolución acuosa para valores de pH comprendidos entre 4 y 11.

Cuando el pH es inferior a 3, existen otros equilibrios ácido-base en los que participan el resto de grupos funcionales de la estructura pterínica, como los nitrógenos anulares o el grupo amino de la posición 2 del anillo. A medida que disminuye el pH estos grupos comienzan a protonarse, apareciendo las correspondientes formas catiónicas con carga +1, +2 y +3. Todos estos equilibrios presentan valores de pK_a inferiores a 4 [Albert, 1953]. En disoluciones acuosas

con un pH inferior al pK_a correspondiente, estos compuestos se encuentran en su forma protonada.

Los derivados pterínicos presentan un equilibrio tautomérico (Figura 19). Los cálculos teóricos demostraron que el tautómero 4-ceto (lactama) es el más estable, mientras que la estructura del enol (lactima) presenta aproximadamente 6 kcal mol⁻¹ más de energía. Otras tres estructuras neutras tienen cerca de 4 kcal mol⁻¹ más que la lactama. Además, existen estudios donde revelaron que el anión lactima es la estructura más estable en la química de las pterinas desprotonadas [Murata, 2007; Soniat, 2009]. Por lo tanto, a pH superior a 5, la forma lactama se encuentra en equilibrio con el anión de lactima correspondiente.

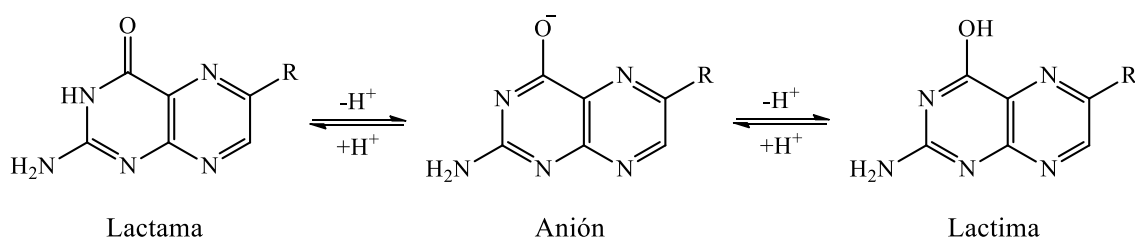


Figura 19. Tautómeros lactama y lactima de las formas neutra y aniónica de las pterinas en disolución acuosa.

3.3. ESPECTROS DE ABSORCIÓN

Las características espectrales de los derivados pterínicos en disolución acuosa dependen de diferentes factores, tales como el estado de oxidación del anillo pirazina, la naturaleza química de los sustituyentes unidos al doble anillo y las condiciones de pH del medio. El espectro de absorción de la mayoría de las pterinas aromáticas no conjugadas presenta dos bandas principales [Cabrerizo, 2005; Thomas, 2002 (a)]. La banda correspondiente a la transición $S_0 \rightarrow S_2$ de la forma ácida presenta un máximo de absorción a aproximadamente 280 nm, mientras que para la forma alcalina se encuentra en 255 nm. La intensidad de esta transición es menor para la forma ácida que para la alcalina. Por otra parte, la banda de menor energía correspondiente a la transición $S_0 \rightarrow S_1$ de la forma ácida presenta un corrimiento hacia el azul ($\lambda_{\text{máx}} \approx 340 - 350$ nm) con respecto a la forma alcalina ($\lambda_{\text{máx}} \approx 350 - 360$ nm). La Figura 20 muestra los espectros de absorción de las formas ácida y alcalina de Ptr en disolución acuosa.

3.4. REACTIVIDAD QUÍMICA DE LAS PTERINAS

Generalmente, las disoluciones acuosas de pterinas aromáticas son estables al aire, aunque esta propiedad cambia ligeramente en función del sustituyente presente en la posición 6. Por ejemplo, las disoluciones de Ptr y Cap son estables

durante varias semanas, mientras que las disoluciones de Bip y Fop permanecen sin descomponerse sólo algunos días. Por otra parte, las disoluciones acuosas de las dihidropterinas presentan una elevada inestabilidad.

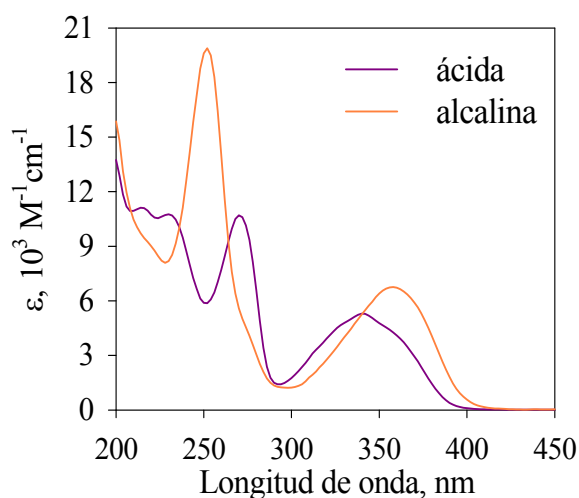


Figura 20. Espectros de absorción de las formas ácida y alcalina de la Ptr en disolución acuosa.

Con respecto a la reactividad frente a H_2O_2 , en los 7,8-dihidroderivados se produce la ruptura del sustituyente y la oxidación del átomo de carbono 6 [Dántola, 2008], mientras que las pterinas oxidadas no reaccionan con H_2O_2 .

Dependiendo del estado de oxidación del anillo de pirazina, las pterinas presentan una reactividad muy diferente frente a $^1\text{O}_2$. Mientras que los 7,8-dihidroderivados son desactivadores muy eficientes de esta especie [Dántola, 2007], la reactividad química de las pterinas oxidadas es muy baja [Cabrerizo, 2007]. La desactivación de $^1\text{O}_2$ por Ptr, 6-metilpterina (Mep) y 6,7-dimetilpterina (Dmp) tiene lugar mediante un proceso físico, mientras que en el caso de los dihidroderivados ocurre principalmente mediante un proceso químico [Dántola, 2007]. Cuando Ptr reacciona con $^1\text{O}_2$ se produce la ruptura del anillo, generando productos no pterínicos.

3.5. LAS PTERINAS EN LA NATURALEZA

Se han encontrado numerosos derivados pterínicos en sistemas biológicos. Algunos de ellos han sido extensamente estudiados y se conocen las funciones que desempeñan en sistemas vivos. En cambio, para otros su función permanece desconocida. A continuación se presentarán brevemente algunos ejemplos de pterinas naturales.

3.5.1. Pigmentos en insectos

Algunas pterinas se encuentran como pigmentos en las alas de diversas mariposas. En particular, el pigmento amarillo aislado de las alas de una mariposa

denominada *brimstone* (azufre), es xantopterina. Otros derivados pterínicos extraídos de alas de mariposas son leucopterina (blanco) [Wieland, 1925 (a); Schöpf, 1926] e isoxantopterina (amarillo) [Wieland, 1925 (b)]. En la [Figura 21](#) se muestran las estructuras químicas de estos compuestos.

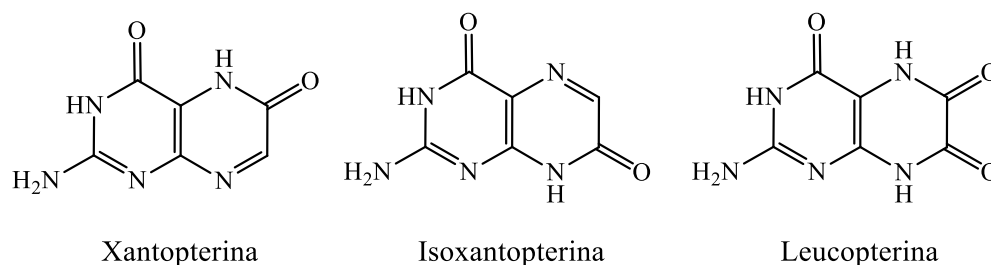


Figura 21. Estructura química de pterinas encontradas en las alas de ciertas mariposas.

3.5.2. Ácido fólico

PteGlu es una vitamina hidrosoluble incluida en el complejo vitamínico B. La biosíntesis de este compuesto se produce sólo en plantas, bacterias y hongos. El derivado activo de esta molécula es el ácido 5,6,7,8-tetrahidrofólico, normalmente denominado tetrahidrofolato, que actúa como coenzima transportando unidades activas de un átomo de carbono. La variedad e importancia de las reacciones metabólicas en las que participa este derivado hacen que sea una molécula indispensable para la vida de los mamíferos [Stryer, 2008].

El folato es esencial para la síntesis de los nucleótidos del ácido desoxirribonucleico (ADN) en células en división. Por lo tanto, su déficit afecta principalmente a células que requieren duplicación celular constante, como por ejemplo, las células sanguíneas y las de la mucosa del tubo digestivo. Esto provoca anemia megaloblástica y síndrome de malabsorción respectivamente. También se demostró que el folato es esencial para el desarrollo normal del tubo neural del embrión y para la espermatogénesis [Jablonski, 2000].

3.5.3. Tetrahidrobiopterina

Otro derivado pterínico que participa en reacciones bioquímicas del metabolismo de los animales es la 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (H₄Bip), que es un derivado reducido de Bip. A diferencia de PteGlu, este compuesto puede ser sintetizado por los seres humanos [Gadiparthi, 1985]. La síntesis se describe brevemente en la [Figura 22](#). H₄Bip participa en una reacción de gran importancia en el metabolismo de los aminoácidos, consistente en la transformación de fenilalanina a tirosina. El proceso está catalizado por fenilalanina hidroxilasa. Esta enzima pertenece a la familia de las monooxigenasas, las cuales catalizan reacciones en las que participa el O₂ disuelto en el medio. Uno de los átomos del

mismo se incorpora al compuesto que se oxida (generalmente se hidroxila), mientras que el restante aparece en forma de H_2O (Figura 23). Por otro lado, H_4Bip es cofactor de numerosas enzimas involucradas en la síntesis de neurotransmisores.

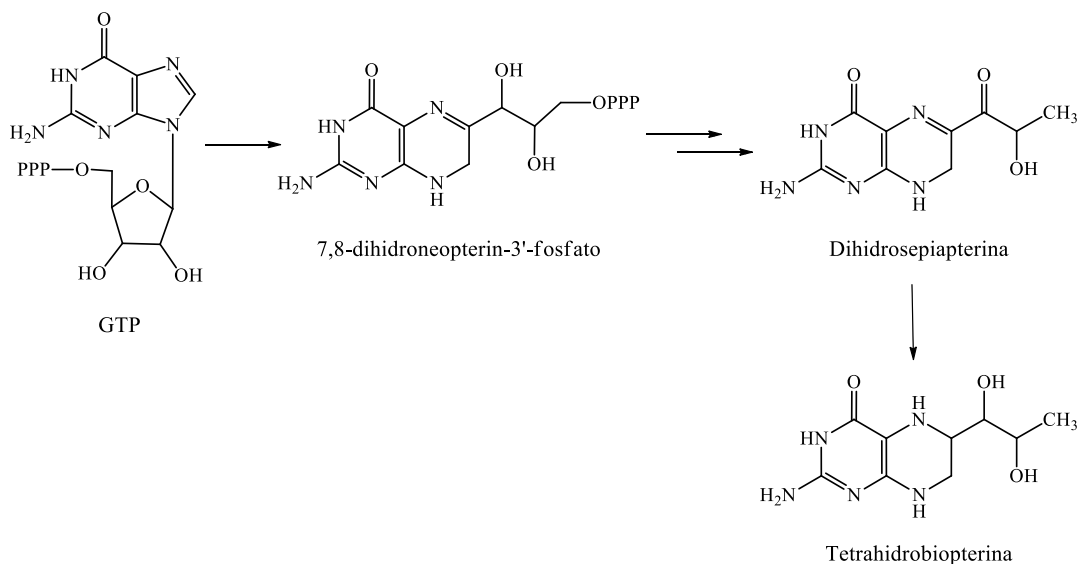


Figura 22. Biosíntesis de tetrahidrobiopterina.

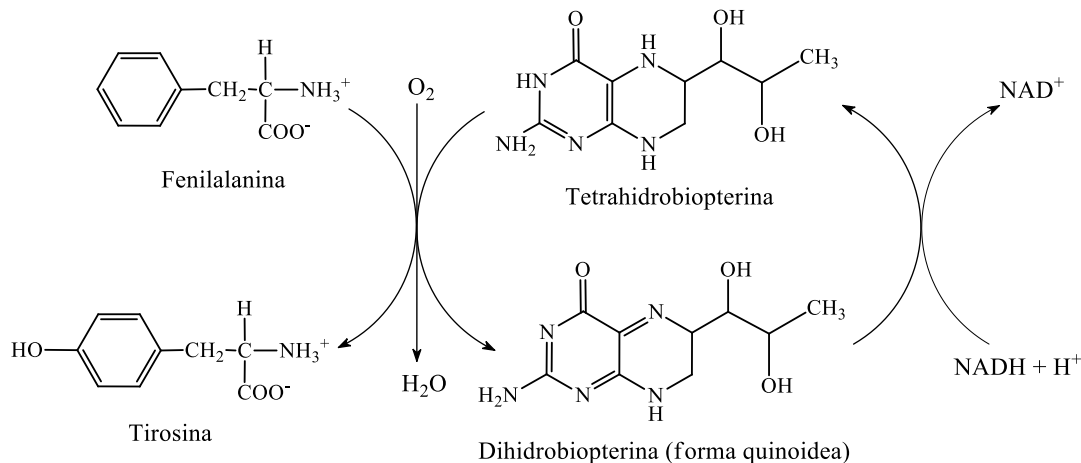


Figura 23. Participación de la tetrahidrobiopterina en la conversión de fenilalanina a tirosina.

3.5.4. Neopterin

Su principal interés bioquímico proviene de su participación en procesos inmunológicos. Los linfocitos y los macrófagos realizan un papel esencial en la respuesta inmune celular de los mecanismos de defensa del organismo frente a enfermedades. Cuando los linfocitos-T reconocen antígenos en la superficie de las

células de los tejidos, se activan y producen citoquinas, concretamente interferón γ (INF- γ). Este último estimula a los macrófagos, que sintetizan y liberan al medio especies reactivas de oxígeno (EROs), factor de necrosis tumoral (TNF- α), H₂Nep y Nep [Hevel, 1992].

Investigaciones clínicas realizadas en la década de los noventa revelaron que la determinación de la concentración de Nep en distintos fluidos biológicos (suero, fluido cerebroespinal u orina) es una herramienta muy útil para monitorear la respuesta inmunológica mediada por células [Fuchs, 1992]. A pesar de que Nep es un marcador inespecífico de respuesta inmunológica, generalmente su aumento precede a síntomas clínicos. También se puede emplear como indicador de estrés oxidativo, ya que su concentración se correlaciona con productos de oxidación de proteínas y con la pérdida de antioxidantes como la vitamina E [Murr, 2001]. Una de las aplicaciones médicas más importantes que tiene la determinación de la concentración de este compuesto, es su utilización como prueba de cribado en bancos de sangre como un indicador de activación inmune.

Por otra parte, se puede apreciar que un derivado de Nep es un metabolito intermediario de la biosíntesis de BH₄ (Figura 22), sintetizada a partir de guanosina trifosfato por la GTP-ciclohidrolasa I [Gadiparthi, 1985].

3.5.5. Pterinas como fotorreceptores

Los fotorreceptores son sustancias que están incluidas en estructuras proteicas complejas, como grupos prostéticos necesarios para generar una señal química a partir del fenómeno primario de absorción de luz. Se han encontrado algunos derivados pterínicos en órganos fotosensibles, como por ejemplo, en los ojos de vertebrados e invertebrados [Pirie, 1946]. Particularmente, la pterorhodina fue aislada de varios insectos y anfibios y parece estar ampliamente distribuida en el reino animal [Pfleiderer, 1993; Kühn, 1959; Viscontini, 1970; Misuraca, 1977]. Esta sustancia presenta un color rojo muy intenso y su estructura consta de dos moléculas de xantopterina unidas por un puente de un átomo de carbono. En los ojos de la *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) se encontró otro interesante grupo de pterinas naturales, las drosopterinas (Figura 24) [Lederer, 1940; Viscontini, 1957; Scwink, 1973]. Debido a las características espectrales de las pterinas y a su amplia distribución en órganos fotosensibles de gran variedad de seres vivos, se ha postulado que estos compuestos podrían actuar como fotorreceptores en muchos procesos biológicos. Por consiguiente, las propiedades fotofísicas y fotoquímicas de las pterinas y compuestos relacionados han adquirido gran interés.

Recientemente se demostró que un derivado pterínico (meteniltetrahidrofolato) actúa como fotoantena en dos fotorreceptores, las fotoliasas y los criptocromos. Las fotoliasas sólo están presentes en bacterias, mientras que los criptocromos se encuentran también en plantas y animales (incluidos los humanos). Estas proteínas comparten una secuencia de aminoácidos

The image displays two chemical structures. On the left is Pterorhodina, a symmetrical pteridine derivative with two amino groups at the 2 and 6 positions of the terminal rings. On the right is Drosoptertina, an unsymmetrical pteridine derivative with an amino group at the 2 position of the terminal ring and a methyl group at the 7 position of the central ring.

Nc1nc2c(nc(=O)[nH]2)c(=O)[nH]1C3=CN=C(N)C(=O)N3

Pterorhodina

Nc1nc2c(nc(=O)[nH]2)c(=O)[nH]1C3=CC(=CN3)C4=CC(=O)N=C(N)C4=O

Drosoptertina

3.6. VITILIGO

Los pacientes con vitiligo presentan un gran aumento de la síntesis de novo de H₄Bip y una alteración de la ruta de reciclado de este cofactor [Kaufman, 1970, Huang, 1973; Ayling, 1997]. El aumento de los niveles de este tetrahidroderivado conlleva a la acumulación de H₂Bip y 7-H₄Bip (un isómero de H₄Bip) [Curtius, 1990]. Este último es un potente inhibidor de la actividad de la primera enzima en la ruta de la síntesis de melanina (PAH) [Davis, 1992]. Como consecuencia de la baja actividad de PAH, aumentan los niveles de fenilalanina en piel, favoreciendo la síntesis de H₄Bip y aumentando aún más los niveles del tetrahidroderivado. El

incremento de los niveles de fenilalanina y de 7-H₄Bip, la disminución de la actividad enzimática y la oxidación no enzimática de H₄Bip a qH₂Bip, llevan a la generación y acumulación de H₂O₂ en la piel de estos pacientes (Figura 25) [Davis, 1992; Schallreuter, 1999]. Esta acumulación conduce a la inactivación de la enzima catalasa [Aronoff, 1965], haciendo que en los melanocitos el medio se vuelva fuertemente oxidante debido a las altas concentraciones de H₂O₂ (de orden milimolar). El aumento de los niveles de especies oxidantes en las manchas despigmentadas se demostró con biopsias de piel, donde se encontró un alto grado de vacuolación y peroxidación lipídica.

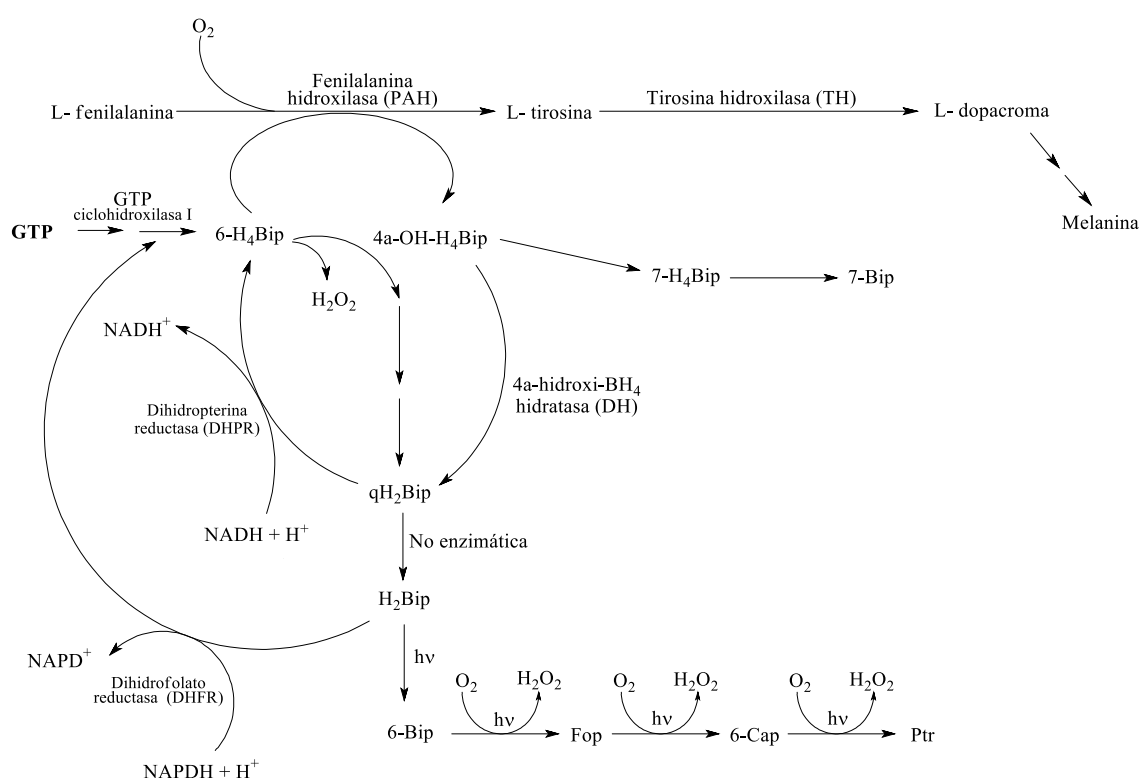


Figura 25. Síntesis de novo, reciclado y regulación de la síntesis de H₄Bip que tiene lugar en la melanogénesis.

Además de la inhibición de PAH, se ha demostrado que en los tejidos afectados por vitiligo se produce la inhibición de varias de las enzimas de la melanogénesis, aunque en la mayor parte de los casos los mecanismos involucrados en dichos procesos no están dilucidados. A partir de este hecho, el estudio de la fotoquímica de los compuestos presentes en la piel y, en particular, de los procesos fotosensibilizados que afectan a las macromoléculas adquiere gran relevancia.

A pesar de que ciertos autores postulan la oxidación de H₄Bip y H₂Bip a 6-biopterina (6-Bip) y de 7-H₄Bip a 7-biopterina (7-Bip) por parte de H₂O₂ [Rokos, 2002; Moore, 2002], posteriormente se demostró que H₂Bip es oxidada por esta especie reactiva de oxígeno dando como principal producto H₂Xap [Dántola,

2008]. Esto último conduce al interrogante de cuál es el origen de la presencia de pterinas oxidadas en la piel de los pacientes que sufren esta enfermedad. Por otro lado, recientemente se demostró que la irradiación de H₂Bip en presencia de aire produce su oxidación a Bip [Vignoni, 2010]. Por lo tanto, esta vía podría ser la responsable de la formación de pterinas oxidadas en la piel de pacientes afectados por vitiligo. En definitiva, aunque no esté claro cuál es el primer mecanismo que perturba la homeostasis de H₄Bip, se sabe que estas alteraciones metabólicas conducen a una situación en la cual se tiene un tejido expuesto a la radiación solar, sin protección contra la misma y donde se acumulan metabolitos fotoquímicamente activos.

4. FOTOQUÍMICA Y FOTSENSIBILIZACIÓN DE LAS PTERINAS

Desde hace varios años se conoce que determinadas pterinas oxidadas y algunos derivados reducidos son fotosensibles cuando se encuentran en disolución acuosa. En este capítulo se hará un breve resumen de los antecedentes acerca del comportamiento fotofísico y fotoquímico de algunos derivados pterínicos. Por otra parte, se recapitularán los antecedentes de esta familia de compuestos en la participación de reacciones fotosensibilizadas.

4.1. FOTOFÍSICA DE PTERINAS

4.1.1. Propiedades de los estados excitados singlete

Se han realizado numerosos estudios sobre los estados excitados de diferentes compuestos pterínicos, especialmente de pterinas oxidadas. Las propiedades fluorescentes de las pterinas aromáticas, es decir, los espectros de emisión y excitación, el rendimiento cuántico de fluorescencia y el tiempo de vida de fluorescencia, dependen de varios factores [Thomas, 2002 (b); Cabrerizo, 2005; Lorente, 2004]. Por un lado, la naturaleza química del sustituyente unido a la posición 6 del anillo pterínico juega un papel primordial. Mientras que las pterinas conjugadas presentan una fluorescencia despreciable, las no conjugadas son compuestos muy fluorescentes. El pH del medio es otro factor significativo, debido a que la forma ácido-base también afecta a las características de emisión de estos compuestos. Concretamente, en medio alcalino los espectros de emisión presentan un desplazamiento hacia longitudes de onda de menor energía (entre 10 y 20 nm), si se comparan con los obtenidos en medio ácido. Este efecto es razonable si se tienen en cuenta los cambios observados en los espectros de absorción al modificar el pH del medio (Apartado 3.3). Por otra parte, los espectros de emisión normalizados de las pterinas no conjugadas son independientes de la longitud de onda de excitación, indicando que la emisión de fluorescencia sólo tiene lugar desde el estado excitado singlete de menor energía (S_1).

En la Tabla 3 aparecen los valores reportados en literatura de la longitud de onda del máximo de emisión (λ_F), del rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_F) y del tiempo de vida de fluorescencia (τ_F) para varias pterinas aromáticas [Thomas, 2002 (b); Cabrerizo, 2005; Lorente, 2004]. Para todos los compuestos mencionados en la Tabla 3, los valores de Φ_F de las formas ácidas son superiores que los de las alcalinas. También puede apreciarse una fuerte dependencia de la naturaleza del sustituyente, por ejemplo, el ácido *p*-aminobenzóico genera una drástica disminución de los valores de Φ_F en las pterinas conjugadas. Otro aspecto remarcable, es que los decaimientos de fluorescencia siguen un comportamiento

exponencial de primer orden y el valor de τ_F es superior para las formas ácidas que para las alcalinas, teniendo además una clara dependencia con el tipo de sustituyente en la posición 6 del anillo.

Compuesto	pH	$\lambda_F (\pm 5 \text{ nm})$	Φ_F	$\tau_F (\pm 0.4 \text{ ns})$	Φ_Δ
Ptr	5.5	439	0.33 ± 0.01	7.6	0.18 ± 0.02
	10.5	456	0.27 ± 0.01	5.0	0.30 ± 0.02
Mep	5.5	448	0.61 ± 0.01	13.6	0.10 ± 0.02
	10.5	460	0.61 ± 0.04	13.2	0.14 ± 0.02
Fop	5.5	446	0.12 ± 0.01	7.9	0.45 ± 0.05
	10.5	454	0.07 ± 0.01	2.2	0.47 ± 0.02
Cap	5.5	439	0.28 ± 0.01	5.8	0.27 ± 0.03
	10.5	451	0.18 ± 0.01	4.1	0.37 ± 0.02
Bip	5.5	441	0.36 ± 0.01	9.1	0.34 ± 0.01
	10.5	455	0.29 ± 0.01	7.6	0.40 ± 0.03
Nep	5.5	440	0.38 ± 0.01	8.9	0.23 ± 0.01
	10.5	454	0.31 ± 0.01	7.4	0.34 ± 0.04
PteGlu	5.5	445	< 0.005	-	< 0.02
	10.5	455	< 0.005	-	< 0.02

Tabla 3. Longitud de onda del máximo de emisión (λ_F), rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_F), tiempo de vida de fluorescencia (τ_F) y rendimiento cuántico de producción de 1O_2 (Φ_Δ) de la forma ácida y alcalina de algunos derivados pterínicos aromáticos.

La fluorescencia de las pterinas oxidadas en disolución puede ser desactivada por nucleótidos, en un proceso dependiente de la estructura química del desactivador y del pH del medio [Petroselli, 2009]. Los nucleótidos púricos (dGMP y dAMP), desactivan el estado excitado singlete de la forma ácida de las pterinas a través de una combinación de procesos estáticos y dinámicos. La desactivación por dCMP es menos eficiente y se da mediante un proceso meramente dinámico. En medio alcalino, la desactivación por los nucleótidos púricos tiene lugar mediante un proceso puramente dinámico, mientras que la desactivación por dCMP es despreciable.

4.1.2. Propiedades de los estados excitados tripletes

En los estudios de absorción de transientes de pterinas por la técnica de fotólisis de destello láser (LFP, por sus siglas en inglés *Laser Flash Photolysis*),

se postula que al excitar una disolución de Ptr a 355 nm se observan en simultáneo tanto especies tripletes como radicales [Chahidi, 1981]. Los autores asignaron dos de estos transientes a estados tripletes de Ptr. Uno de ellos con un máximo de absorción a 550 nm y un tiempo de vida del estado excitado triplete (τ_T) de $2.3 \pm 0.2 \mu s$, mientras que el otro transiente posee dos máximos de absorción a 415 y 600 nm y un τ_T de $0.3 \pm 0.1 \mu s$. Según los autores del trabajo, la existencia de dos estados excitados triplete se debe al equilibrio tautomérico presente en el estado fundamental de Ptr (Apartado 3.2). En otro trabajo realizado con Bip se reportaron dos estados excitados tripletes con sus correspondientes τ_T de 2 y 3 μs , proponiendo una hipótesis similar a la anterior [Ledbetter, 1995].

Se estudió la fosforescencia de un gran número de derivados pterínicos a temperatura ambiente y 77 K en medio alcalino mediante el método de detección en fase sólida [Parker, 1979]. Generalmente, la emisión fosforescente de estos compuestos presenta una banda intensa centrada a 500 nm. En otro trabajo, se estudió la emisión fosforescente de Ptr en una mezcla de agua y etilenglicol a 77 K [Chahidi, 1981]. Estas disoluciones presentaron un espectro muy intenso con un máximo de emisión de fosforescencia (λ_P) principal a 480 nm y un segundo máximo de menor intensidad a 440 nm. Los autores lo asignaron a la presencia de dos estados excitados triplete correspondientes a las dos formas tautoméricas, también observadas a temperatura ambiente. Los valores de los tiempos de vida de emisión fosforescente (τ_P) son del orden del segundo (1.1 y $0.9 \pm 0.1 s$). A partir de los espectros de fosforescencia se determinó la energía del primer estado excitado triplete ($\Delta E_{0,0}^T$), obteniendo un valor comprendido entre 243 y 270 kJ mol⁻¹ [Chahidi, 1981; Song, 2007; Estébanez, 2018]. Este valor es suficiente para transferirle la energía al O₂ en estado fundamental y generar ¹O₂.

Todas las pterinas no conjugadas presentan una elevada eficiencia de producción de ¹O₂ cuando se encuentran en disolución acuosa y bajo irradiación UV-A [Thomas, 2003; Cabrerizo, 2004; Cabrerizo, 2006]. En cambio, las pterinas conjugadas no generan esta especie reactiva de oxígeno, como es el caso del PteGlu. En la Tabla 3 se detallan los valores de los rendimientos cuánticos de producción de ¹O₂ (Φ_Δ) para algunos derivados pterínicos. Para explicar la diferencia observada con el PteGlu, se propuso que la cadena lateral actúa como desactivador interno, aumentando la velocidad de desactivación no radiativa (IC) del estado excitado singlete. Así, la emisión es muy débil y el cruce entre sistemas extremadamente ineficiente, y por lo tanto, no se genera ¹O₂. Por último, los valores revelan que tanto la naturaleza del sustituyente de la posición 6 del anillo pterínico como el pH del medio afectan significativamente los valores de Φ_Δ , siendo mayor en medio alcalino para las pterinas estudiadas.

4.2. REACTIVIDAD FOTOQUÍMICA DE PTERINAS AROMÁTICAS

En general, las disoluciones aireadas de pterinas aromáticas bajo irradiación UV-A sufren reacciones de oxidación, provocando modificaciones en el

sustituyente localizado en la posición 6. Los mecanismos involucrados en estos procesos de fotooxidación dependen de la naturaleza del sustituyente localizado en la posición 6 y del pH del medio. Por consiguiente, la fotoquímica de la forma ácida o básica de un determinado derivado pterínico puede ser muy diferente.

Los compuestos pterínicos que no tienen un sustituyente oxidable en la posición 6 del anillo, como ocurre con Ptr, Mep o Cap, son estables cuando sus disoluciones se irradian en ausencia de O₂. Sin embargo, cuando la irradiación ocurre en presencia de O₂ se produce la oxidación de la molécula, con la consecuente ruptura del anillo, generando productos no pterínicos y H₂O₂ [Suárez, 2000; Cabrerizo, 2005]. No obstante, estas reacciones se dan lentamente, con valores de rendimiento cuántico de consumo del reactivo (Φ_R) mucho menores que los correspondientes de los derivados que poseen sustituyentes oxidables (Tabla 4).

Compuesto	pH	$\Phi_R(10^{-3})$
Ptr ^a	5.5	0.82 ± 0.06
	10.5	1.20 ± 0.20
Mep ^b	5.5	0.24 ± 0.05
	10.5	0.81 ± 0.08
Fop ^{c,d}	5.5	40.00 ± 2.00
	10.5	35.00 ± 2.00
Cap ^a	5.5	5.10 ± 0.50
	10.5	1.30 ± 0.20
PteGlu ^{c,e}	5.5	25.00 ± 2.00
	10.5	5.10 ± 0.40

Tabla 4. Rendimiento cuántico de consumo (Φ_R) de pterinas aromáticas en disoluciones aireadas. a) [Suárez, 2000]; b) [Cabrerizo, 2005]; c) [Thomas, 2000]; d) [Thomas, 2001]; e) [Thomas, 2002 (a)].

4.3. PROPIEDADES FOTSENSIBILIZADORAS DE LAS PTERINAS

A finales de los años noventa se demostró que las pterinas son capaces de fotoinducir modificaciones químicas en el ácido desoxirribonucleico. Posteriormente, se evaluó la capacidad fotosensibilizadora de las pterinas sobre otras biomoléculas y se dilucidaron los mecanismos de reacción involucrados. En

este apartado se hará un breve resumen de los resultados más relevantes desarrollados hasta el momento.

4.3.1. Efectos fotodinámicos sobre células eucariotas

Bajo irradiación UV-A se observó el efecto fotodinámico de Ptr y Lum sobre una línea cancerígena de células eucariotas (células HeLa) a pH fisiológico [Denofrio, 2009; Denofrio, 2011]. Ambos fotosensibilizadores interaccionan con las células penetrando y localizándose dentro de los dominios, o bien, asociándose a las membranas de las mismas. En condiciones de oscuridad, ninguno de los sensibilizadores resultó tóxico para las células. Bajo irradiación UV-A, las células incubadas con Ptr o Lum perdieron la integridad de su estructura. Este evento se relacionó con una falla mitocondrial y con la alteración de las membranas celulares.

4.3.2. Inactivación fotodinámica de bacterias

En un trabajo reciente, se evaluó la eficiencia de la inactivación fotodinámica (PDI) en cultivos planctónicos y *biofilms* de *Staphylococcus aureus* mediante el empleo de Cap bajo radiación UV-A artificial y natural (luz solar) [Miñán, 2015]. Los resultados obtenidos mostraron una excelente disminución de la viabilidad de células planctónicas, logrando una acción bactericida (99.9 % de muerte respecto del inóculo inicial) y erradicadora (eliminación total de las bacterias), a concentraciones de 0.1 y 0.4 μM de Cap respectivamente. Asimismo, esta disminución en la viabilidad de las células planctónicas evitó la formación de *biofilms*, demostrando que la PDI actúa como un método de prevención de formación de *biofilms*, incluso con bajas concentraciones de fotosensibilizador. En el caso de *biofilms* previamente formados, concentraciones superiores a 50 μM lograron un efecto bactericida cuando se irradió con UV-A artificial, mientras que el mismo efecto bajo radiación natural se alcanzó con una concentración del fotosensibilizador de 100 μM . De esta manera se comprobó que la PDI se puede llevar a cabo empleando tanto una fuente de radiación natural como artificial, lo cual es muy útil al momento de contar con un método de inactivación microbiológica en fuentes de agua que se encuentran al aire libre.

4.3.3. Fotosensibilización de aminoácidos y proteínas

Estudios recientes demostraron que Ptr fotosensibiliza aminoácidos, concretamente triptófano (Trp), tirosina (Tyr), metionina (Met) e histidina (His). En presencia de O_2 , el principal mecanismo es la transferencia electrónica desde el sustrato hacia el fotosensibilizador. La formación del radical de Trp se demostró con estudios de resonancia paramagnética electrónica (EPR) [Thomas, 2013 (a)] y LFP [Castaño, 2019]. En el caso de Tyr se detectó la formación de dímeros, que son los responsables del fotoentrecruzamiento en las proteínas. La generación de

los dímeros se da a partir de la recombinación de dos radicales neutros de Tyr (Tyr(-H)[•]) [Castaño, 2013; Reid, 2017].

Estas reacciones también pueden tener lugar en péptidos y proteínas. Investigaciones realizadas con la hormona estimulante de melanocitos (α -MSH), péptido corto de tres aminoácidos, demostraron que Ptr fotoinduce daño en el péptido. Durante este proceso, el péptido sufre una oxidación y una dimerización, afectando de forma específica a Trp y Tyr [Castaño, 2014]. La fotodegradación de proteínas inducida por Ptr se estudió con las albúminas séricas bovina y humana (BSA y HSA). Este proceso implica la oxidación de la proteína en al menos dos aminoácidos, Trp y Tyr [Thomas, 2013 (b); Reid, 2016]. Los residuos de Tyr contribuyen a la dimerización de la proteína y, por lo tanto, al entrecruzamiento.

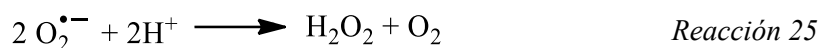
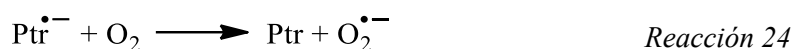
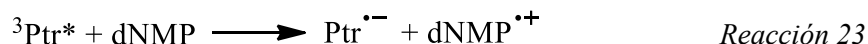
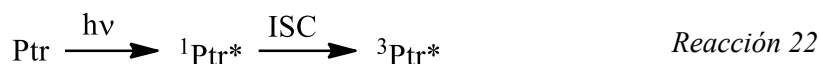
También se realizaron estudios de fotoinactivación de tirosinasa (TYR). Esta enzima es la encargada de catalizar la primera etapa, y a su vez la limitante, de la melanogénesis. Por primera vez se demostró la inactivación de TYR como consecuencia de un proceso fotosensibilizado inducido por Ptr [Dántola, 2012]. El mecanismo está iniciado por una transferencia electrónica desde la enzima al estado excitado triplete de Ptr ($^3\text{Ptr}^*$). Estos resultados son relevantes desde el punto de vista biomédico porque las pterinas se encuentran en la piel humana, particularmente, acumuladas en regiones donde falla la protección contra la radiación UV.

4.3.4. Fotosensibilización del ADN y sus componentes

4.3.4.1. Fotosensibilización de nucleótidos púricos

El antecedente más antiguo reportado en literatura sobre la fotosensibilización de monómeros de ADN por Ptr es del año 1981 [Momzikoff, 1981]. En este estudio se cuantificó el porcentaje de degradación de las bases púricas (adenina, guanina, xantina e hipoxantina) irradiadas en presencia de Ptr, xantopterina o isoxantopterina. Los autores concluyeron que los sustratos que sufren una mayor degradación son guanina y xantina, y por otra parte, que Ptr tiene un efecto fotosensibilizador superior que las pterinas con sustituyentes hidroxilos (xantopterina e isoxantopterina). Postularon que las pterinas pueden actuar tanto mediante una transferencia electrónica (Tipo I) como de energía (Tipo II).

El mecanismo general para la fotodegradación de nucleótidos comienza con la generación de $^3\text{Ptr}^*$ (Reacción 22). A continuación, tiene lugar la transferencia electrónica desde la base hasta $^3\text{Ptr}^*$, generando los correspondientes pares de radicales (Reacción 23). El radical anión reacciona con el O_2 disuelto generando $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Reacción 24), que a su vez puede dismutar para generar H_2O_2 (Reacción 25). El radical catión reacciona con O_2 , H_2O y $\text{O}_2^{\bullet-}$, dando lugar a los diferentes productos oxigenados (Reacción 26). En el proceso sólo hay consumo de nucleótido.



Estudios más recientes acerca de la fotosensibilización de dGMP y dAMP inducida por Ptr en disolución acuosa revelaron varios datos interesantes [Petroselli, 2007; Petroselli, 2008]. Ptr induce modificaciones químicas a dAMP en medio ácido (pH 5.5) a través de un mecanismo Tipo I, pero en medio alcalino (pH 10.5) no tiene lugar la reacción. El O_2 es indispensable para que se produzca la fotooxidación y el ${}^1\text{O}_2$ no participa en la reacción, a pesar de ser generado por el fotosensibilizador. En el proceso se genera H_2O_2 . La reacción se acelera en presencia de superóxido dismutasa (SOD), enzima que cataliza la descomposición de $\text{O}_2^{\bullet-}$. Como producto de oxidación se identificó a la 8-oxo-7,8-dihidro 2'-desoxiadenosina 5'-monofosfato (8-oxodAMP), observada previamente en reacciones fotoinducidas por otros sensibilizadores que actúan a través de mecanismos Tipo I. Además se encontró otro producto que no había sido reportado en publicaciones anteriores, en el que la base se enlaza al grupo fosfato formando un ciclo (Figura 26).

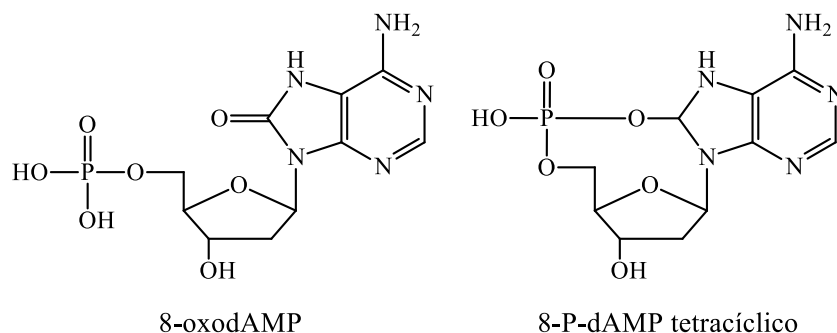


Figura 26. Estructura química de los productos de la oxidación fotosensibilizada de dAMP por Ptr.

Por otra parte, Ptr fotosensibiliza a dGMP tanto en medio ácido como en medio alcalino. Los productos identificados en este caso son los derivados de los desoxirribonucleósidos 5'-monofosfato de imidazolona (dIzMP), dihidroguanidinohidantoína (dDGhMP), guanidinohidantoína (dGhMP), oxazolona (dZMP) y espiroiminodihidantoína (dSpMP) (Figuras 13 y 14, Apartado 2.4.2). También se encontró un producto denominado P680 (por su peso molecular), que está formado por una molécula de dGMP y otra de dDGhMP,

unidas a través de las bases en una reacción donde se pierde una molécula de H₂O (Figura 27). El espectro de absorción de P680 tiene una banda centrada a 335 nm y con una cola de absorción en la región visible. El máximo de su espectro de emisión está centrado a 440 nm, y su rendimiento cuántico de fluorescencia es de 0.031. En este sistema hay una competencia entre los mecanismos Tipo I y Tipo II, y dependiendo del pH del medio se favorece una vía u otra [Petroselli, 2008; Serrano, 2017].

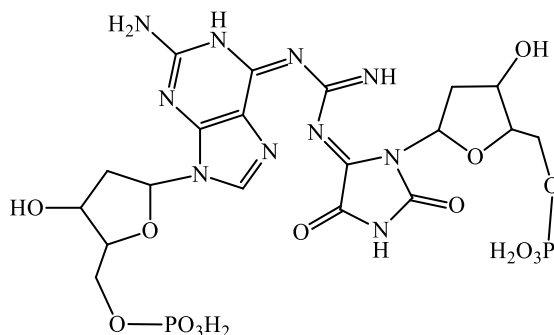
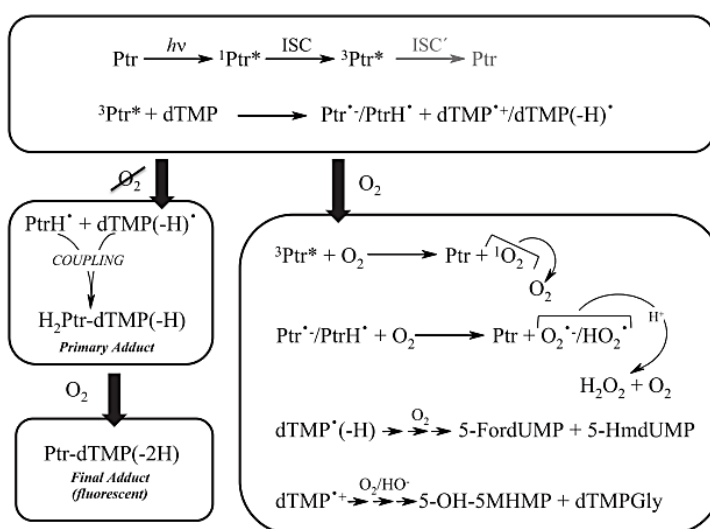


Figura 27. Estructura química del P680 generado en la oxidación fotosensibilizada de dGMP por Ptr.

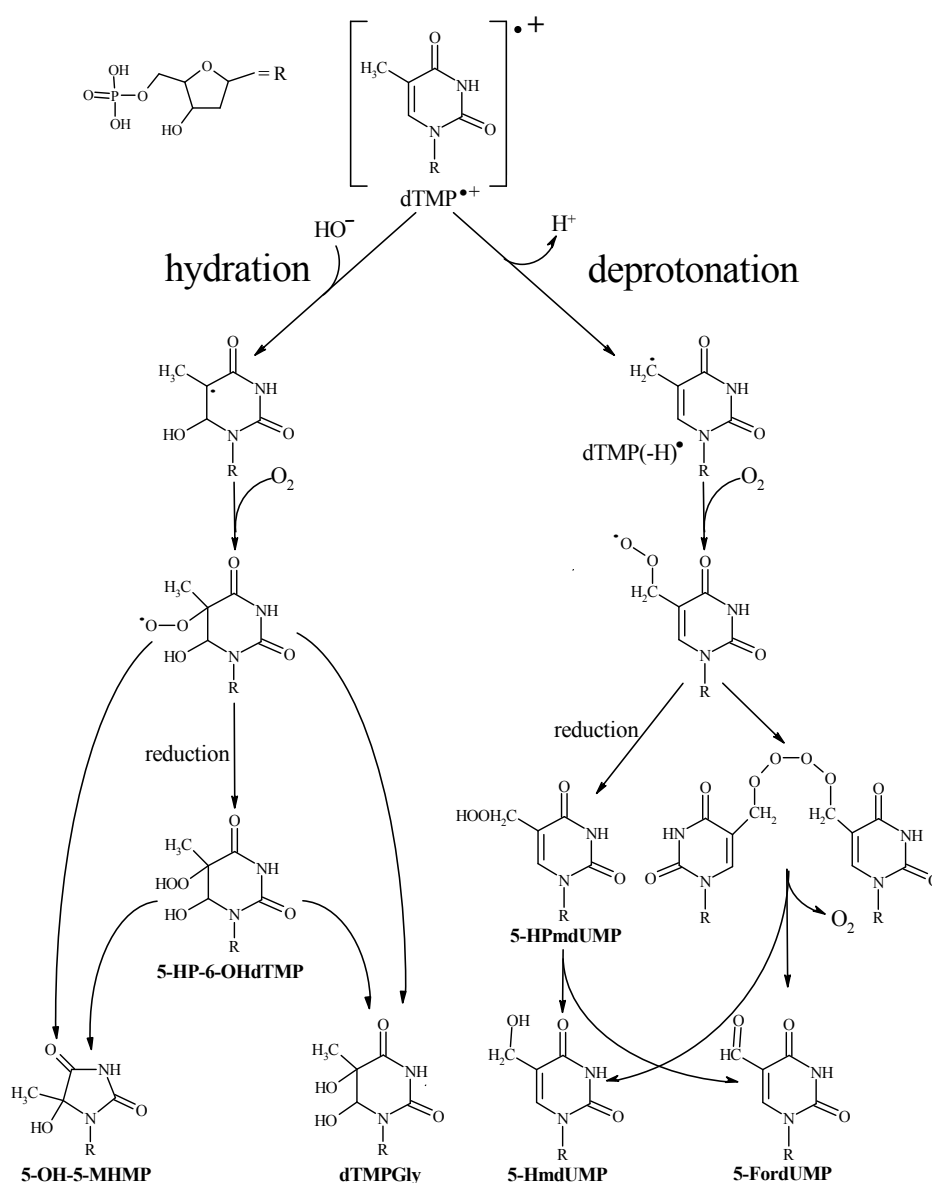
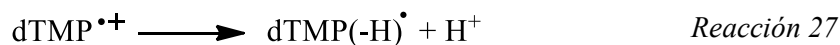
4.3.4.2. Fotosensibilización de nucleótidos pirimidínicos

Estudios recientes revelaron que Ptr es capaz de fotodegradar a dTMP bajo irradiación UV en disolución acuosa a través de un mecanismo Tipo I (Reacciones 22 - 25, Apartado 4.3.4.1) [Serrano, 2016]. Este resultado es sorprendente debido a que Thy es la base del ADN con mayor potencial de oxidación, y por lo tanto, la menos oxidable. El mecanismo de fotodegradación depende de la presencia de O₂ disuelto en el medio (Esquema 4).



Esquema 4. Principales vías de la fotodegradación de dTMP inducida por Ptr [Serrano, 2016].

El radical catión de dTMP presenta dos reacciones competitivas, que son la desprotonación (Reacción 27) y la hidratación (Reacción 28). La unión de un átomo de oxígeno al grupo metileno del radical dTMP(-H) \cdot da lugar a 5-formil-2'-desoxiuridina 5'-monofosfato (5-FordUMP) y 5-hidroximetil-2'-uridina 5'-monofosfato (5-HmdUMP). En cambio, en el radical dTMP(OH) \cdot , el oxígeno se une a la posición 5 y genera 1-(2-desoxi-beta-D-eritro-pentofuranosil-5-fosfato)-5-hidroxi-5-metilhidantoína (5-HO-5MHMP) y timina glicol 5'-monofosfato (dTMPGly) (Esquema 5).



Esquema 5. Vías para la formación de productos obtenidos bajo la irradiación de disoluciones de Ptr y dTMP en presencia de O_2 [Serrano, 2016].

Por otra parte, cuando la reacción ocurre en ausencia de O_2 el comportamiento es completamente diferente y no se había observado con otros sensibilizadores. Sorprendentemente no sólo hay consumo de sustrato, sino que la concentración de fotosensibilizador también disminuye con el tiempo de irradiación, y el consumo de los reactivos se da en una relación 1:1. Estudios de espectrometría de masas revelaron que se forma un aducto entre el nucleótido y Ptr, con un peso molecular que coincide con la suma de las masas de Ptr y dTMP, menos dos átomos de hidrógeno que se pierden en la formación del enlace covalente. Este producto, Ptr-dTMP(-2H), es interesante debido a que presenta propiedades espectroscópicas similares a las de Ptr. Su formación se puede explicar con el acoplamiento de los radicales $PtrH^{\bullet}$ y $dTMP(-H)^{\bullet}$ (Esquema 4).

4.3.4.3. Fotosensibilización de ADN plasmídico

Se han realizado estudios de fotosensibilización del plásmido pUC18 utilizando Ptr como sensibilizador [Lorente, 2000]. Este plásmido es una molécula de ADN circular de doble hebra y bajo peso molecular. Los autores demostraron que cuando la mezcla se expone a radiación UV-A (350 nm) las hebras del ADN sufren cortes al azar. Como consecuencia, el topoisómero superenrollado se transforma en el topoisómero relajado. La acumulación de estos cortes termina ocasionando un corte en la doble hebra, convirtiendo el plásmido circular en una molécula lineal. Los autores encontraron que la reacción ocurre tanto en presencia como en ausencia de O_2 , pero no hallaron diferencias en la cantidad de plásmido relajado. Por lo tanto, descartan la participación de EROs en el mecanismo de reacción.

Otros estudios realizados con el plásmido PBR 322 y Cap, confirmaron que se producen cortes en la cadena de ADN por irradiación UV-A [Offer, 2007]. Sin embargo, los autores no pueden descartar la participación de 1O_2 , basándose en que la reacción fotosensibilizada se inhibe cuando se agrega un secuestrador inespecífico de 1O_2 (azida sódica) al medio de reacción.

4.3.4.4. Fotosensibilización de ADN eucariota

Cuando se expone ADN eucariota de doble hebra a radiación de 365 nm en presencia de Ptr, Cap, Bip, Nep o PteGlu se generan lesiones en secuencias específicas [Ito, 1997; Hirakawa, 2003]. La eficiencia del daño decrece en el siguiente sentido: $Ptr \approx Cap > Bip \approx Nep \gg PteGlu$. Cuando utilizaron xantopterina o isoxantopterina como sensibilizadores no observaron daños en la macromolécula. En estos estudios observaron que las oxidaciones y rupturas tenían lugar en secuencias con varias Gua consecutivas, debido a que el apilamiento de dos bases de Gua en un fragmento de ADN de doble cadena produce una disminución en el potencial de ionización. La detección de radicales por EPR y experimentos realizados en D_2O , permitió postular que el daño fotoinducido al ADN consiste en una oxidación fotosensibilizada Tipo I. Como producto de reacción se detectó 8-oxodG.

ii) MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

5. PREPARACIÓN E IRRADIACIÓN ESTACIONARIA DE DISOLUCIONES

En este capítulo se describirán los procedimientos y las técnicas empleadas para la preparación de las disoluciones acuosas y su irradiación en forma continua con radiación UV-A (≈ 350 nm). Además, se detallará la técnica utilizada para medir la cantidad de radiación que alcanza la celda de reacción en un determinado periodo de tiempo.

5.1. REACTIVOS

El presente trabajo de tesis se realizó con reactivos comerciales de elevada pureza. Las pterinas oxidadas, tales como pterina (Ptr), 6-metilpterina (Mep) y 6,7-dimetilpterina (Dmp) fueron sintetizadas y provistas por el Laboratorio Schircks (Suiza). Todas ellas se utilizaron sin previa purificación, debido a que presentan una pureza mayor al 99 %.

Los sustratos empleados para las reacciones fotosensibilizadas fueron adquiridos en Sigma-Aldrich. Concretamente, se trabajó con:

- Nucleótidos: 2'-desoxiadenosina 5'-monofosfato (dAMP), 2'-desoxiguanosina 5'-monofosfato (dGMP), 2'-desoxicitidina 5'-monofosfato (dCMP) y 2'-desoxitimidina 5'-monofosfato (dTMP).
- Nucleósidos: 2'-desoxitimidina (dT) y 2'-desoxicitidina (dC).
- Oligonucleótidos: el estudio se realizó con cadenas cortas de ADN (5 bases) de simple hebra. Las secuencias de los mismos fueron las siguientes: 5'-d(TTTTT)-3' (dT₅), 5'-d(CCCCC)-3' (dC₅), 5'-d(GGGGG)-3' (dG₅), 5'-d(TTGTT)-3' (TTGTT) y 5'-d(GTTTT)-3' (GTTTT). También se utilizó un oligonucleótido de cadena larga (10 bases) y hebra doble (dA₁₀ – dT₁₀), formado por cadenas de 5'-d(AAAAAAAAAA)-3' (dA₁₀) y 5'-d(TTTTTTTTTT)-3' (dT₁₀).
- ADN de *Calf Thymus* (Tipo I). Este ADN está constituido por un 41.9 % de Gua-Cyt y un 58.1 % de Ade-Thy.

Tanto los nucleótidos como los nucleósidos presentan una pureza superior al 99 %. Los oligonucleótidos se purificaron con técnicas cromatográficas y su calidad fue testada con MALDI-TOF o con espectrometría de masas con ionización por *electrospray*.

Otros reactivos provistos por Sigma-Aldrich fueron hidróxido de sodio (NaOH), D₂O (> 99.9 %), hidróxido de sodio deuterado (NaOD, CEA, > 99 %), ácido clorhídrico deuterado (DCl, 99.5 %), superóxido dismutasa de eritrocito bovino (SOD), tris(hidroximetil)aminometano (TRIS), acetato de amonio (NH₄Ac) y ácido fórmico (HCOOH).

También se trabajó con ácido clorhídrico (HCl, Merck), yoduro de potasio (KI, Laboratorios Cicarelli), acetonitrilo calidad HPLC (ACN, J. T. Baker) y columnas de *Sephadex G-25* (GE Healthcare).

El agua utilizada para preparar las disoluciones fue de calidad Milli-Q (agua destilada purificada en un equipo Milli Q Reagent Water System (resistividad $\sim 10 \text{ M } \Omega \text{ cm}^{-1}$)).

5.2. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES

La preparación y manipulación de las disoluciones de pterinas aromáticas se llevó a cabo en un cuarto oscuro iluminado con luz roja para evitar la fotodegradación de los reactivos. El procedimiento general consistió en disolver el sólido en agua libre de iones metálicos y mantenerlo en agitación durante aproximadamente una hora. Debido a que las pterinas presentan grupos ionizados en medio alcalino (Figura 18), se agregaron unos 10 – 100 μL de una disolución de NaOH 0.1 – 2 M para facilitar la disolución del compuesto. Las disoluciones de los fotosensibilizadores son estables durante al menos dos semanas si se almacenan en frascos de color caramelo, ya que se evita la degradación por la exposición a la luz. Las concentraciones de estas disoluciones variaron entre 50 y 300 μM .

Tanto los nucleótidos como los nucleósidos presentan elevada solubilidad en agua, por lo que se prepararon disolviendo el sólido correspondiente en agua a pH neutro. Los oligonucleótidos y el ADN se prepararon en *buffer* TRIS. La concentración de TRIS en las mezclas de reacción fue de 4 y 10 mM, respectivamente.

Para determinar la concentración de una disolución se recurrió a diferentes métodos:

- i. A partir de la cantidad de sólido pesado, el volumen de la disolución y el valor del peso molecular del compuesto.
- ii. A partir del factor de dilución y de la concentración (calculada según i) de una disolución más concentrada.
- iii. A partir de medidas de absorbancia y con los correspondientes coeficientes de absorción molar a una determinada longitud de onda aplicando la ley de Lambert-Beer (Ecuación 11), que establece que la absorbancia de un determinado compuesto es directamente proporcional a su concentración.

$$[P] = \frac{A_{\lambda}}{\epsilon_{\lambda}^P l} \quad \text{Ecuación 11}$$

donde [P] es la concentración del compuesto, A_{λ} es el valor de la absorbancia a una determinada longitud de onda, ϵ_{λ}^P es el coeficiente

de extinción molar a una determinada longitud de onda y l es el camino óptico en cm. Los principales coeficientes de absorción molar utilizados se resumen en la [Tabla 5](#).

Compuesto	Coefficiente de absorción molar, ϵ_{λ} ($M^{-1}cm^{-1}$)
P _{tr} ^a	ϵ_{340} (pH 5.5) = 5300 ϵ_{360} (pH 10.5) = 6723
Mep ^a	ϵ_{346} (pH 5.5) = 6045 ϵ_{364} (pH 10.5) = 7431
Dmp ^a	ϵ_{344} (pH 5.5) = 6526 ϵ_{358} (pH 10.5) = 7609
dAMP ^b	ϵ_{260} = 15060
dGMP ^b	ϵ_{260} = 12180
dCMP/dC ^b	ϵ_{260} = 7100
dTMP/dT ^b	ϵ_{260} = 8560
dT ₅ ^c	ϵ_{260} = 41100
dC ₅ ^c	ϵ_{260} = 36200
dG ₅ ^c	ϵ_{260} = 51900
TTGTT ^c	ϵ_{260} = 43700
GTTTT ^c	ϵ_{260} = 44300
dT ₁₀ ^c	ϵ_{260} = 81600
dA ₁₀ ^c	ϵ_{260} = 123400
ADN de <i>Calf Thymus</i> ^d	ϵ_{260} (bp) = 13200

Tabla 5. Coeficientes de absorción molar de los principales fotosensibilizadores y sustratos utilizados. a) Determinados por pesada; b) [Cavaluzzi, 2004]; c) Provistos por Sigma Aldrich; d) [Kumar, 1993].

El pH de trabajo cambió en función del compuesto utilizado y de cada experimento. En los ensayos realizados con los nucleótidos, nucleósidos y oligonucleótidos se trabajó a pH 5.5 con el fin de tener una única especie ácido-

base de Ptr. Así, en el medio sólo se encuentra presente la especie protonada, ya que el pK_a es cercano a 8, como se vio en el [Apartado 3.2](#). Con fines comparativos, en algunos casos se trabajó a pH 10.5, donde la forma predominante de Ptr es la alcalina. Los experimentos con ADN se realizaron en disoluciones tampón de TRIS 10 mM a pH 6.5 para mantener la estructura B de la macromolécula, que es la conformación fisiológica más relevante [O'Connor, 1981; Tajmir-Riahi, 1995 (b)]. En este caso, hay una mezcla de las formas ácida y básica de Ptr.

El ajuste del pH se llevó a cabo con el agregado de pequeños volúmenes de disoluciones de HCl y NaOH (0.1 – 2 M) con una micropipeta. El HCl se preparó a partir de una dilución de la disolución comercial concentrada, mientras que el NaOH se preparó por pesada de dicho reactivo y su posterior disolución en agua. Las medidas de pH se realizaron con un pH-metro *sensION+ pH31 GLP* combinado con un electrodo de pH 5010T (Hach), con un microelectrodo combinado con un electrodo de pH modelo pH3359-8 (*Radiometer Analytical*) o con un pH-metro *Mettler Toledo Seven Easy*. Para la calibración de los mismos se utilizaron disoluciones amortiguadoras comerciales con valores de pH de 4.00, 7.00 y 10.00.

Las mezclas de reacción se prepararon de diferentes formas en función del tipo de experimento. Una de ellas consistió en preparar la mezcla de sustrato y fotosensibilizador, y a continuación, llevarla a pH. La otra opción fue realizar la mezcla de ambas disoluciones previamente llevadas a pH. En todos los casos, antes de comenzar las medidas se controlaron los espectros de absorbancia y el pH.

5.3. EXPERIMENTOS EN CONDICIONES ESPECIALES

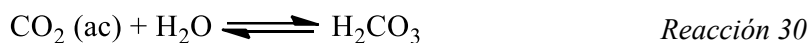
5.3.1. Bajo diferentes atmósferas

En ciertas ocasiones se quiso estudiar el efecto de la concentración de O_2 disuelto en el medio de reacción. Las disoluciones equilibradas con aire presentan una concentración de 1.28 mM a 25 °C aproximadamente. Esta concentración se puede modificar si se hace pasar un determinado gas a través de la disolución durante un periodo de tiempo. Para trabajar en diferentes atmósferas, las disoluciones se equilibraron con O_2 y Ar. Si la disolución está saturada con O_2 , la concentración de este gas es cinco veces superior a la de las disoluciones equilibradas en aire. Sin embargo, cuando se satura con Ar se desplaza el O_2 disuelto, consiguiendo una concentración de O_2 cercana a cero. De esta forma, se podrá trabajar con disoluciones a tres concentraciones de O_2 diferentes: equilibradas en aire, saturadas con O_2 y en condiciones anaeróbicas.

Para esto, fue necesario el uso de celdas con tapa de rosca y séptum de silicona. Dichas celdas se llenaron con uno o tres mililitros de la mezcla de reacción (celdas de 1x0.4 cm y 1x1 cm respectivamente). El séptum se atravesó

con dos agujas. Una corta, que no tocaba la disolución y operaba como vía de salida, y otra de mayor longitud, que llegaba al fondo de la celda y actuaba como vía de entrada del gas (O_2 o Ar en función del experimento). Las disoluciones se burbujearon durante 20 – 30 minutos con un flujo de gas continuo y constante. La disposición de las agujas permitió que la presión del interior de la celda y la externa (atmosférica) fuera idéntica, evitando que se genere una condición de sobrepresión en el interior de la celda. Para retirar las agujas, en primer lugar se sacó la de salida (generando una pequeña sobrepresión) y en segundo lugar se sacó la de entrada. Para evitar el intercambio de gases se cubrió la parte superior de la celda con *parafilm*.

Es importante mencionar que durante los burbujeos también se elimina el CO_2 presente en la disolución, el cual está en equilibrio con H_2CO_3 (ácido débil parcialmente disociado en disolución acuosa) (Reacciones 29 - 31).



Por lo tanto, si se elimina el CO_2 de las disoluciones, los equilibrios de estas reacciones se desplazan hacia la izquierda, y por lo tanto, disminuye la concentración de protones del medio. Como consecuencia, se produce una alcalinización de la disolución. Aprovechando que las propiedades espectrales de Ptr cambian con el pH del medio (Figura 20), se utilizó esta propiedad como un indicador indirecto del pH. Para ello, se registraron los espectros de absorción antes y después de burbujear y se comprobó que no hubiera desplazamientos en el espectro, asegurando la forma ácido-base del derivado pterínico deseado.

Burbujear una disolución durante tiempos prolongados puede provocar la pérdida de disolvente por el arrastre de moléculas de agua con la corriente de gas. Para prevenir cambios en la concentración de los compuestos, los gases (inicialmente libres de agua) se pasaron a través de una trampa con agua para saturar el gas con el disolvente antes de burbujear la disolución.

5.3.2. En presencia de yoduro de potasio

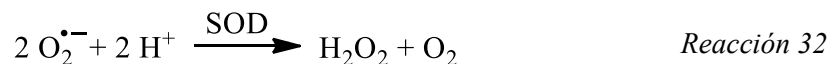
Algunos estudios se realizaron en presencia de desactivadores específicos de estados excitados. Esto ocurre con ciertos iones inorgánicos, que son capaces de desactivar los estados excitados de moléculas orgánicas en un fenómeno conocido como efecto del átomo pesado [Guidi, 1996]. En el presente trabajo de tesis doctoral, se empleó el anión yoduro (I^-) como desactivador de los estados excitados de los fotosensibilizadores de estudio. A determinadas concentraciones, dicho anión es capaz de desactivar tanto los estados excitados singletes como los estados excitados tripletes de las pterinas. Ptr presenta valores muy similares de las constantes de desactivación del S_1 y T_1 , siendo $k_{qs} = (9 \pm 1) \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $k_{qt} =$

$(4.9 \pm 0.6) \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ respectivamente [Denofrio, 2014]. Sin embargo, debido a la diferencia en los tiempos de vida de los correspondientes estados excitados (Apartado 4.1), se puede desactivar uno u otro si se elige adecuadamente la concentración de I $^-$. Por ejemplo, para desactivar el 90 % de S $_1$ se necesita aproximadamente una concentración de 100 mM. Sin embargo, la concentración requerida para desactivar el mismo porcentaje de T $_1$ es de 0.5 mM. Por lo tanto, se trabajó con concentraciones de KI comprendidas entre 0.3 y 0.5 mM para que la mayor parte de los estados excitados tripletes estuvieran desactivados, mientras que la desactivación de los estados excitados singletes fuera menor al 2 %.

El procedimiento general de trabajo consistió en irradiar disoluciones acuosas de fotosensibilizador y sustrato en presencia y en ausencia de KI bajo las mismas condiciones experimentales (pH, geometría de irradiación, intensidad de radiación, concentraciones de reactivos, etc.). Posteriormente, se realizó la comparación de las velocidades de consumo en ambas condiciones. Si el estado excitado triplete del fotosensibilizador está implicado en el proceso fotoquímico, se observará una disminución de la velocidad de consumo del sustrato cuando en el medio se encuentra presente el KI.

5.3.3. En presencia de superóxido dismutasa

La superóxido dismutasa (SOD) es una enzima que cataliza la dismutación de O $_2^{\bullet-}$ en H $_2$ O $_2$ y O $_2$ (Reacción 32).



Para estudiar la posible participación de O $_2^{\bullet-}$ en el mecanismo de reacción, se irradiaron disoluciones de fotosensibilizador y sustrato en presencia y en ausencia de SOD.

Las disoluciones de SOD se prepararon a partir de una disolución concentrada de la misma (1000 U/mL), previamente preparada a partir de la disolución de cierta masa del sólido en agua. La disolución madre se fraccionó y se congeló en alícuotas de 500 μL para posteriores usos. La estabilidad de la enzima se comprobó antes y después de ser congelada. En todos los experimentos se trabajó con una concentración de SOD de 50 U/mL en mezcla, concentración suficiente para eliminar todo el O $_2^{\bullet-}$ del medio.

En términos generales, si se observa un aumento en la velocidad inicial de consumo de sustrato, lo que ocurre es que se está eliminando la vía de recuperación del mismo.

5.4. IRRADIACIÓN ESTACIONARIA DE LAS DISOLUCIONES

La irradiación continua consiste en iluminar una muestra con luz de intensidad constante y conocida procedente de una lámpara. El tiempo de

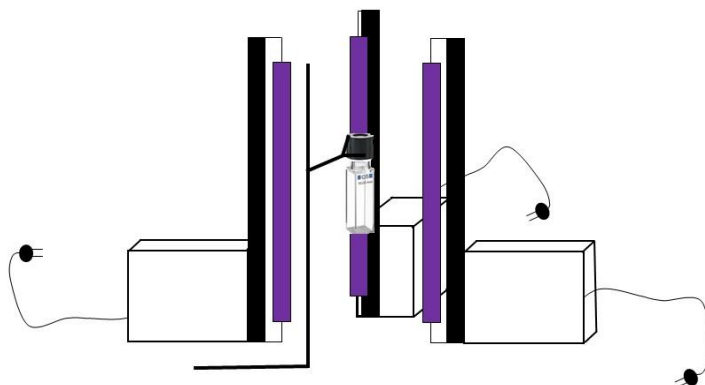
irradiación es relativamente largo, ya que puede durar desde unos pocos segundos hasta unas horas. Este tiempo se considera largo por comparación con las técnicas de fotólisis de destello láser, en las cuales, el destello de luz puede durar desde unos pocos milisegundos hasta el femtosegundo, en función de la técnica empleada. Los experimentos en los que se estudian reacciones fotoquímicas inducidas por irradiación continua se conocen como fotólisis continuas o estacionarias.

5.4.1. Sistemas de irradiación

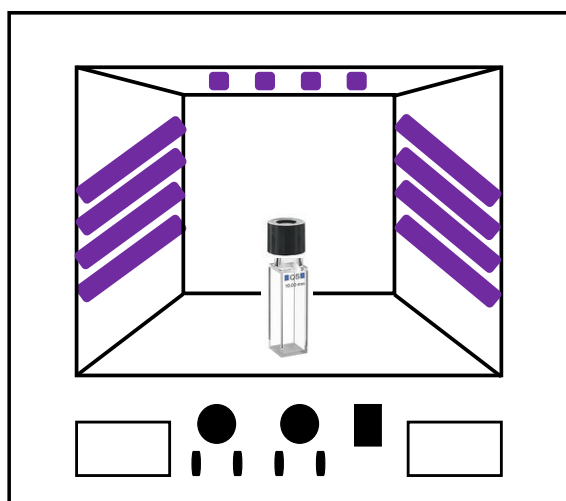
Los estudios se realizaron con sistemas de irradiación de diferente geometría. Esto dependió principalmente del laboratorio donde se llevaron a cabo los experimentos, ya que se realizaron estancias en el exterior durante el desarrollo de la tesis doctoral.

✚ Sistema de irradiación I. Como fuente de irradiación se utilizaron lámparas *Rayonet Photochemical Reactor Lamp, RPR 3500 A*, fabricadas por la empresa *Southern N. E. Ultraviolet Co.* Estas lámparas emiten radiación a una longitud de onda máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) de 350 nm y presentan un ancho total a mitad de máximo de emisión de aproximadamente 20 nm. El sistema cuenta con tres lámparas Rayonet RPR 3500 A colocadas alrededor de una celda de fluorescencia (**Esquema 6**). Se utilizaron celdas de 1x1 cm con un volumen de disolución de 3 mL o de 1x0.4 cm con un volumen de 1 mL. El camino óptico para la irradiación fue de 1 cm para las tres lámparas en el caso de las celdas de 1x1 cm. Por otra parte, para las celdas de 1x0.4 cm, el camino óptico fue de 1 cm para una lámpara y de 0.4 cm para las otras dos lámparas. Este sistema no requiere la agitación de la disolución debido a que la irradiación proviene de todas las direcciones, por lo que la muestra se irradia de forma completa y uniforme. Además se colocó un ventilador con el fin de evitar el calentamiento de la muestra durante la irradiación debido al calor desprendido por las lámparas. Este sistema se colocó dentro de una ‘caja negra’ para impedir el ingreso de luz proveniente del exterior.

✚ Sistema de irradiación II: fotorreactor equipado con 12 lámparas (Osram Sylvania, F15T8/BLB) y un ventilador para evitar el sobrecalentamiento de las disoluciones. Se colocaron cuatro lámparas en la pared derecha del fotorreactor, cuatro en la pared izquierda y cuatro en la parte superior (**Esquema 7**). Las lámparas emiten en la región de 310-410 nm y presentan su máximo de emisión centrado en 360 nm (1 mW/cm²). Se utilizaron celdas de fluorescencia de 1x1 cm con un volumen de disolución de 2 – 3 mL. Este sistema de irradiación tampoco precisó de agitación, ya que la muestra se irradió homogéneamente desde todas las direcciones.



Esquema 6. Representación gráfica del sistema de irradiación I provisto de tres lámparas Rayonet RPR 3500 A colocadas alrededor de una celda de fluorescencia.



Esquema 7. Representación gráfica del sistema de irradiación II provisto de 12 lámparas (Osram Sylvania, F15T8/BLB) colocadas dentro de un fotorreactor.

El tiempo de irradiación fue medido con un cronómetro de disparo manual, comenzando a contar desde el instante en el que se encendían las lámparas. La geometría de ambos sistemas de irradiación se mantuvo invariable durante los experimentos.

5.4.2. Metodología general para la toma de muestras

Tras la irradiación de las disoluciones durante diferentes tiempos, se procedió a la toma de muestra para el posterior análisis. Se adoptaron dos procedimientos generales para el muestreo:

- ✚ Medidas realizadas de forma consecutiva con la misma alícuota de disolución original. Se irradia la disolución en la celda durante un

determinado periodo de tiempo, se corta la irradiación y se procede al análisis de la misma por espectrofotometría y cromatografía líquida de alta resolución. A continuación, se devuelve la disolución irradiada a la celda y se repite el procedimiento. Si la reacción estaba siendo estudiada bajo condiciones anaeróbicas, la disolución se burbujeaba con Ar antes de cada irradiación. En ningún caso se redujo el volumen de la celda más de un 10 % del volumen inicial para no alterar la geometría del sistema. Este procedimiento se empleó principalmente en las reacciones fotosensibilizadas de los oligonucleótidos, ya que no era posible preparar gran cantidad de mezcla de reacción.

- Medidas realizadas con alícuotas frescas de la disolución original. Tras la irradiación de la disolución, la totalidad de la muestra se retira de la celda para ser procesada. A continuación se carga la celda con disolución nueva, lavando la celda previamente, y se repite el procedimiento. Si el estudio se estaba haciendo bajo condiciones anaeróbicas, la disolución era burbujeada con Ar antes de cada irradiación.

5.5. ACTINOMETRÍA

La actinometría permite determinar la intensidad de la radiación incidente sobre la disolución ($q_{p,\lambda}^0$). Se trabajó con *Aberchrome 540* (Aberchromics Ltd.) como actinómetro químico [Braun, 1991], que es adecuado para lámparas con emisión a una $\lambda_{\text{máx}}$ de 350 nm. Este compuesto es el anhídrido del ácido (E) α -(2,5-dimetil-3-furiletilden)(isopropiliden) succínico (DFIS), que tras ser irradiado con una longitud de onda entre 310 y 370 nm genera el 7,7a-dihidro-2,4,7,7a-pentametilbenzo[b]furano (7,7a-DHBF) de color rojo intenso. Este fotoproducto presenta una banda de absorción entre 436 y 546 nm, y cuando es excitado en esta región se regenera DFIS, es decir, la reacción ocurre en sentido inverso. En la [Figura 28](#) se representan las estructuras químicas de ambos compuestos y sus respectivos espectros de absorción.

El DFIS es soluble en diferentes medios y la longitud de onda del máximo no se ve alterada por la naturaleza del disolvente ($\lambda_{\text{máx}}(\text{DFIS}) = 343 \text{ nm}$; $\epsilon(\text{DFIS}) = 6077 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Sin embargo, la longitud de onda del 7,7a-DHBF varía considerablemente con la naturaleza del medio ($\lambda_{\text{máx}}(7,7\text{a-DHBF}) = 494 \text{ nm}$; $\epsilon(7,7\text{a-DHBF}) = 8200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ en tolueno). Todas las medidas realizadas para esta tesis doctoral se realizaron disolviendo el *Aberchrome 540* en tolueno.

El $q_{p,\lambda}^0$ depende de los factores geométricos del sistema de irradiación, tales como la distancia de la celda a la(s) lámpara(s), las dimensiones de la celda, el volumen de disolución colocado en la celda, el camino óptico de irradiación, etc. Por ello, si se quiere realizar una comparación de la eficiencia de diferentes procesos, es importante no alterar la geometría del sistema durante los experimentos. Su unidad en el sistema internacional (SI) es el s^{-1} . Si se expresa

con la cantidad de moles de fotones (einsteins), las unidades pasan a ser mol s^{-1} [Bourdelande, 1999]. El $q_{p,\lambda}^0$ se puede calcular a partir de la Ecuación 12:

$$q_{p,\lambda}^0 = \frac{\partial[7,7a - DHBF]}{\partial t} \frac{1}{\Phi_{Ac}} \quad \text{Ecuación 12}$$

donde Φ_{Ac} es el rendimiento cuántico del actinómetro, cuyo valor es de 0.2 para la conversión de DFIS a 7,7a-DHBF por radiación UV y es independiente del disolvente usado.

Según la Ley de Lambert-Beer (Ecuación 13):

$$[7,7a - DHBF] = \frac{A^{494}}{\epsilon_{494} l} \quad \text{Ecuación 13}$$

donde A^{494} es la absorbancia a 494 nm, $\epsilon_{494} = 8200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (en tolueno) y l es el camino óptico de la celda por el que se registra la absorbancia. Por lo tanto, la Ecuación 12 se puede expresar de la siguiente forma:

$$q_{p,\lambda}^0 = \frac{A^{494}/\partial t}{\epsilon_{494} l} \frac{1}{\Phi_{Ac}} \quad \text{Ecuación 14}$$

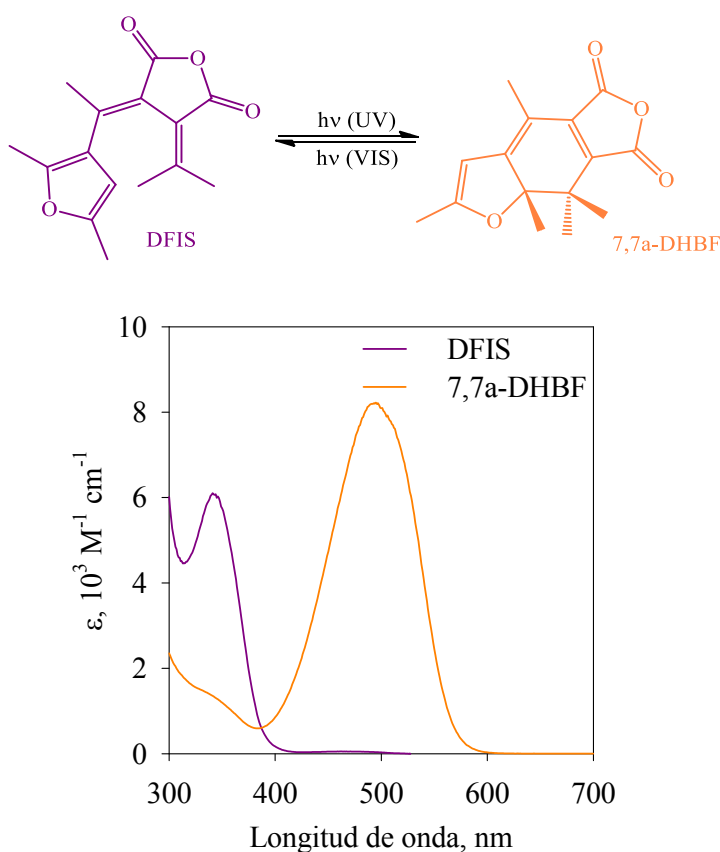


Figura 28. Estructura química de los isómeros del Aberchrome 540 junto con sus respectivos espectros de absorción registrados utilizando tolueno como disolvente.

La actinometría se realiza preparando una disolución de DFIS con una absorbancia a 350 nm mayor de 2, con el fin de asegurar que el 99 % de la radiación es absorbida por el actinómetro. Posteriormente se irradia a 350 nm durante diferentes periodos de tiempo y se registra la absorbancia a 494 nm ($\lambda_{\text{máx}}$). Se representa dicha absorbancia en función del tiempo de irradiación y se realiza una regresión lineal de los datos. Con el valor de la pendiente se calcula $q_{p,\lambda}^0$ utilizando la Ecuación 14.

A modo de ejemplo, se muestran los espectros de absorción obtenidos al irradiar el DFIS utilizando el sistema de irradiación I (Esquema 6) en una celda de 1x1 cm (Figura 29). Los valores de $q_{p,\lambda}^0$ obtenidos con este sistema de irradiación fueron de 1.8 y 3.1 (± 0.1) $\times 10^{-5}$ einstein $\text{L}^{-1} \text{cm}^{-1}$ para las celdas de 1x1 y 1x0.4 cm respectivamente.

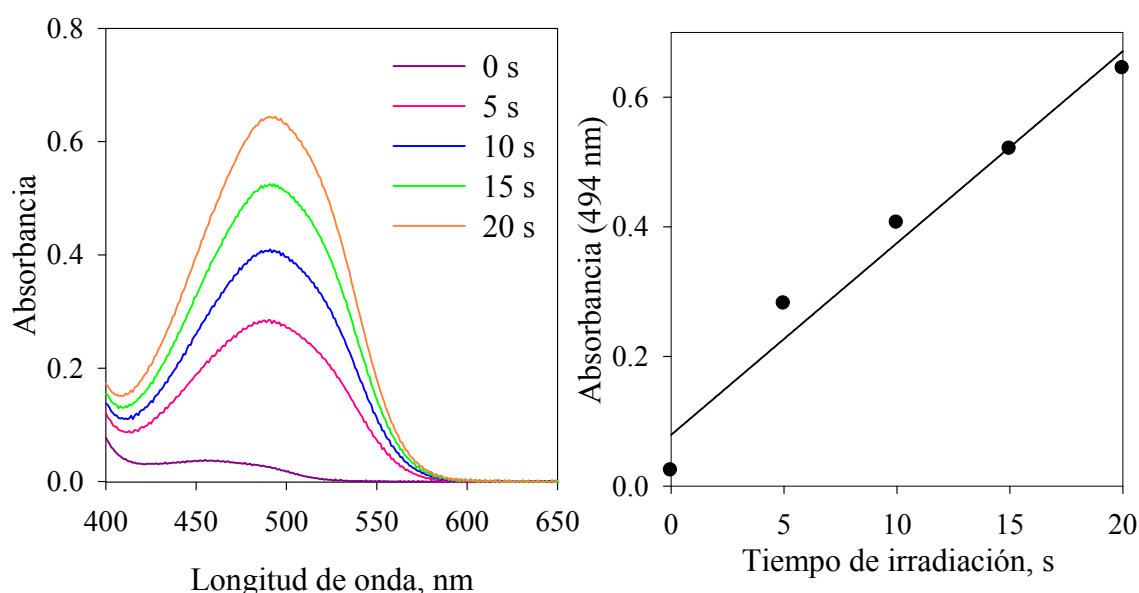


Figura 29. a) Evolución temporal de los espectros de absorción de una disolución de DFIS irradiada con el sistema de irradiación I. b) Variación de la absorbancia a 494 nm en función del tiempo de irradiación; $l = 1$ cm.

6. ANÁLISIS DE LAS DISOLUCIONES. PARTE I

La evolución de los procesos fotoquímicos de las disoluciones expuestas a radiación UV-A fue seguida con la ayuda de diferentes técnicas, tales como: i) espectrofotometría UV-Visible; ii) cromatografía líquida de alta resolución con detección espectrofotométrica y fluorimétrica; iii) espectrometría de masas. Estas técnicas, junto con las que aparecerán en el siguiente capítulo, permitieron identificar, caracterizar y cuantificar tanto a los reactivos como a los productos de las reacciones. Al mismo tiempo, nos brindaron información importante acerca de los mecanismos de reacción involucrados en cada caso.

6.1. ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE

Esta técnica analítica es una de las más utilizadas debido a su sencillez y versatilidad. Se fundamenta en la medida directa de la absorción de radiación electromagnética por la muestra. Un espectro de absorción es un registro de la intensidad de absorción de luz por una muestra en función de la longitud de onda (o frecuencia) de la luz incidente. Indica qué longitudes de onda son absorbidas por la molécula en estudio al pasar de niveles de menor a mayor energía. Las bandas observadas en el espectro dan información sobre las diferencias energéticas entre los estados electrónicos de una molécula. Esta técnica no permite caracterizar a un compuesto, pero proporciona información acerca de si una molécula ha sufrido cambios estructurales. Por ejemplo, una sustancia con equilibrios ácido-base presentará un espectro de absorción diferente para cada una de sus formas, lo que permite distinguirlas fácilmente.

Los espectros de absorción se registraron con los siguientes espectrofotómetros: UV-1800 (*Shimadzu*) y S2000 (*Ocean Optics*). El *Shimadzu* es un espectrofotómetro de barrido de doble haz con alta sensibilidad y precisión, que permite registrar espectros entre los 190 y los 900 nm. Por otra parte, el *Ocean Optics* cuenta con detección por arreglo de diodos y es de simple haz. Este último permite registrar espectros en el rango de 200 a 800 nm y cuenta con la ventaja de dar una respuesta rápida. Ambos equipos cuentan con programas adecuados para registrar y almacenar los espectros.

En todos los experimentos se registraron los espectros de absorción a diferentes tiempos de irradiación. Cuando se observan cambios espectrales, se puede afirmar que ha tenido lugar una reacción química.

6.2. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una técnica que permite separar los componentes de una mezcla por la diferencia en la

distribución de los compuestos entre una fase móvil líquida y otra fase fija. La muestra pasa a través de la fase estacionaria (columna cromatográfica) mediante el bombeo de la fase móvil a alta presión. Los componentes de la muestra avanzan con diferentes velocidades en función de los distintos tipos de interacciones químicas o físicas que se generan entre los componentes a analizar, la columna cromatográfica y las fases móviles empleadas. El tiempo que un compuesto tarda en ser eluido de la columna se conoce como tiempo de retención (t_R), y es una característica propia del compuesto para unas condiciones de fase estacionaria y fase móvil determinadas. La representación gráfica de la señal proporcionada por el detector en función del tiempo se denomina cromatograma. El valor de la señal viene dado en unidades arbitrarias (u. a.). Existe una gran variedad de propiedades que se pueden registrar tras la separación de los componentes de la muestra, como por ejemplo, la absorbancia, la fluorescencia, el índice de refracción, la conductividad, etc. En los experimentos realizados durante la presente tesis doctoral se utilizó esta técnica para obtener los perfiles de concentración, tanto de reactivos como de productos, y para realizar la identificación de los productos generados durante las reacciones fotosensibilizadas.

Para ello se empleó un HPLC *Shimadzu Prominence* LC-20A (Figura 30). Este equipo cuenta con un módulo de distribución de disolventes (LC-20AT), un degasificador en línea (DGU-20A5), un módulo controlador (CBM-20), un inyector automático (SIL-20A HT), un horno (CTO-10AS-VP) y un colector (FRC-10A). Además, tiene acoplados dos sistemas de detección. En primer lugar, un detector espectrofotométrico UV-Visible de arreglo de diodos (PDA, SPD-M20A, *Shimadzu*) que permite monitorear todas las longitudes de onda entre 200 y 800 nm. Por otra parte, un detector de emisión de fluorescencia (FL, RF-M20A) que permite fijar la longitud de onda de excitación entre 300 y 600 nm, y hacer un registro a dos longitudes de onda de forma simultánea en un rango comprendido entre 300 y 800 nm. El programa de adquisición de datos (*LC Solution*) permite registrar y analizar las señales obtenidas con ambos detectores, así como extraer los espectros de absorción de cada uno de los picos cromatográficos obtenidos con el detector PDA.

En los estudios con nucleótidos, nucleósidos y oligonucleótidos se trabajó con una columna de fase reversa Synergi 4 μm POLAR-RP 80A (150 x 4.6 mm, 4 mm, Phenomenex). La fase estacionaria contiene grupos fenilo unidos mediante una función éter a las partículas con protección hidrofílica, que permiten maximizar la retención y la selectividad de los analitos polares y aromáticos. La principal ventaja de esta columna es su alta estabilidad con fases móviles acuosas. La fase móvil se modificó en función del sistema de estudio:

- ✚ Nucleótidos: método isocrático a un flujo de 1 mL/min con 100 % de ácido fórmico 25 mM a pH 3.3 o 97 % de ácido fórmico 25 mM a pH 3.3 y 3 % de ACN.
- ✚ Nucleósidos: método isocrático con 97 % de ácido fórmico 25 mM a pH 3.3 y 3 % de ACN a un flujo de 1 mL/min.

- ✚ **Oligonucleótidos:** método en gradiente con una mezcla de dos disolventes: disolvente A, acetato de amonio 10 mM (pH = 7.0); disolvente B, ACN. El flujo fue de 1 mL/min. El perfil de elución fue: 0 min, 100 % A; 5 min, 100 % A; 20 min, 90 % A, 10 % B; 25 min, 90 % A, 10 % B; 30 min, 100 % A; 45 min, 100 % A.

En los estudios con ADN se trabajó con una columna de exclusión molecular BioSep-SEC-s2000 (sílica, 300 x 7.8 mm, 14.5 μ m, *Phenomenex*). La fase estacionaria cuenta con un gel de sílica con baja adsorción que permite una alta recuperación de la muestra. Como fase móvil se utilizó *buffer* TRIS 20 mM a pH 7.0 con un flujo de 1 mL/min.



Figura 30. Fotografía del equipo Shimadzu Prominence LC-20A. A: ordenador y programa para el análisis de los datos (LC Solution), B: degasificador, C: módulo de distribución de disolventes, D: módulo controlador, E: inyector automático, F: horno y columna, G: colector de muestras, H: detector UV/Vis (PDA), I: detector de fluorescencia (FL).

6.2.1. Purificación de productos con HPLC

Algunos de los productos generados en las reacciones fotosensibilizadas se aislaron de forma manual con el HPLC para su posterior estudio. La recolección de la muestra se hizo a la salida del PDA. Las condiciones empleadas se detallan a continuación:

- ✚ **Aducto Ptr-dT:** se inyectaron mezclas de Ptr y dT irradiadas durante 3 – 4 horas en ausencia de O₂ y se aisló el aducto con tiempo de retención de 11.2 minutos de forma pura. Se trabajó con un método isocrático a un flujo de 1 mL/min, conteniendo 97 % de agua a pH 3.3 y 3 % de ACN. Se realizaron inyecciones con un volumen que osciló entre 300 y 600 μ L y se siguió el cromatograma a 340 nm.

✚ Aducto Ptr-dT₅: se inyectaron mezclas de Ptr y dT₅ irradiadas durante 60 minutos en ausencia de O₂ y se recolectó la fracción de producto que aparece entre los 22 y los 23 minutos de tiempo de retención. Esta fracción contiene una mezcla del producto y del oligonucleótido intacto, debido a que no se consiguieron separar por cromatografía. Se utilizó un método en gradiente con una mezcla de dos disolventes: disolvente A, agua (pH = 7.0); disolvente B, ACN. El flujo fue de 1 mL/min. El perfil de elución fue: 0 min, 100 % A; 5 min, 100 % A; 20 min, 90 % A, 10 % B; 25 min, 90 % A, 10 % B; 30 min, 100 % A; 45 min, 100 % A. Se realizaron inyecciones con un volumen de 400 µL y se siguió el cromatograma a 340 nm.

6.3. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ULTRA-ALTA RESOLUCIÓN CON DETECCIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS

El fundamento de la cromatografía líquida de ultra-alta resolución (UPLC) es el mismo que el de HPLC. La principal diferencia entre ambas técnicas, es que el UPLC presenta un nuevo diseño de columnas (con una nueva tecnología de partícula), de inyectores, de bombas y de detectores que permite trabajar a presiones muy elevadas. El resultado son picos cromatográficos más estrechos y más concentrados que los obtenidos con HPLC.

La espectrometría de masas es una técnica analítica que permite estudiar compuestos de naturaleza muy variada y obtener información estructural de los mismos. En primer lugar hay que ionizar las moléculas para obtener los iones en fase gaseosa. Estos iones son acelerados hacia un analizador y separados en función de su relación masa/carga (m/z) mediante la aplicación de campos magnéticos o eléctricos. Cuando los iones llegan al detector producen una señal eléctrica que es procesada, amplificada y enviada a un ordenador para su posterior análisis. Los espectros de masas aportan información acerca de las abundancias de los diferentes tipos de iones en función de su relación m/z .

Como norma general, el espectrómetro de masas tiene que ser capaz de volatilizar los compuestos, generar los correspondientes iones, separarlos en función de su relación m/z y finalmente, detectarlos. El equipo cuenta con diferentes partes. El sistema de entrada volatiliza las muestras e introduce una pequeña cantidad de las mismas en el equipo. La fuente de ionización convierte los componentes de la muestra en iones. Durante este trabajo de tesis se utilizó un equipo que cuenta con ionización *electrospray* (ESI). En esta técnica de ionización a presión atmosférica, desarrollada por los grupos de Fenn y Aleksandrov durante los años 80, la disolución de la muestra pasa a través de un capilar al que se le aplica un fuerte potencial eléctrico. Esto genera la nebulización de la disolución, es decir, la disolución se dispersa en forma de *spray* creando pequeñas gotas cargadas con la misma polaridad. Con la evaporación del

disolvente se produce una disminución del tamaño de la gota, y por lo tanto, un aumento de la concentración de carga en la superficie de la gota. Cuando la repulsión coulombica supera la tensión superficial de la gota, explota generando gotas de menor tamaño. Este proceso de evaporación del disolvente con la consecuente disminución de volumen y aumento de carga hasta generar la explosión de la gota se repite hasta obtener el analito puro cargado. Para poder detectar estos iones de forma individual, es necesario separarlos con un analizador de masas. En este caso se contó con un analizador cuadrupolar combinado con uno de tiempo de vuelo (Xevo G2-QToF-MS, Waters), ofreciendo una gran precisión en las medidas de masa. El analizador cuadrupolar cuenta con cuatro barras metálicas de sección circular o hiperbólica, dispuestas con gran precisión de forma recta y paralela, a las que se les aplica un potencial combinado de corriente continua y radiofrecuencia. Los iones atraviesan longitudinalmente el espacio comprendido entre las barras. Debido al campo cuadrupolar generado, los iones oscilan y se desvían en función de su relación m/z . Este analizador actúa como un filtro de iones. El analizador de tiempo de vuelo se basa en que los iones acelerados por un campo eléctrico adquieren distintas velocidades en función del valor de su relación m/z , y por lo tanto, tardan distinto tiempo en recorrer una distancia determinada. Este analizador presenta una alta sensibilidad y es capaz de detectar un valor m/z con incertidumbre en el cuarto decimal. El análisis en tándem (MS/MS), es decir, con una segunda etapa de análisis dentro del mismo experimento, permite obtener gran información estructural de la molécula de interés.

Para los experimentos de masas realizados durante esta tesis doctoral se utilizaron dos equipos Xevo G2-QToF-MS (Waters), ambos acoplados a un UPLC (ACQUITY UPLC, Waters) (Figura 31). En la sección de resultados nos referiremos a ellos como “Equipo 1” o “Equipo 2”. El espectrómetro de masas operó tanto en modo negativo (ESI⁻) como en modo positivo (ESI⁺). El analizador (Q-ToF) se calibró empleando ácido fosfórico al 0.1 % en 50:50 MeOH/H₂O (v/v). La deriva del instrumento se compensó aplicando una corrección de bloqueo de masa. El análisis de los resultados se realizó con el programa Masslynx 4.1 (Waters).

A continuación se detallan las condiciones experimentales utilizadas para cada uno de los sistemas:

- ✚ Ptr + dT: columna Acquity UPLC HSS T3 (1.7 μ m; 2.1 x 50 mm; Waters). Elución isocrática con ácido fórmico 25 mM (pH 3.2) y ACN (97:3) a un flujo de 0.5 mL/min.
- ✚ Mep + dT: columna Acquity UPLC HSS T3 (1.7 μ m; 2.1 x 50 mm; Waters). Elución isocrática con ácido fórmico 25 mM (pH 3.2) y ACN (97:3) a un flujo de 0.2 mL/min.
- ✚ Ptr + dC: columna Acquity UPLC HSS T3 (1.8 μ m; 2.1 x 150 mm; Waters). Elución isocrática con una mezcla de agua con un 0.1 % de ácido

fórmico y ACN con un 0.1 % de ácido fórmico (97:3) a un flujo de 0.3 mL/min.

- ✚ Ptr + dT₅: columna Acquity UPLC HSS T3 (1.7 μ m; 2.1 x 50 mm; Waters). La fase móvil fue una mezcla de acetato de amonio (A) y ACN (B) a un flujo de 0.5 mL/min. El perfil de elución fue el siguiente: 0 min, 100 % A, 0 % B; 2 min, 100 % A, 0 % B; 10 min, 90 % A, 10 % B; 11 min, 90 % A, 10 % B.
- ✚ Ptr + oligonucleótidos de cadena corta (dT₅, dC₅, dG₅, TTGTT, GTTTT): columna Acquity UPLC HSS T3 (1.8 μ m; 2.1 x 150 mm; Waters). La fase móvil fue una mezcla de agua con un 0.1 % de ácido fórmico (A) y ACN con un 0.1 % de ácido fórmico (B) a un flujo de 0.3 mL/min. El perfil de elución fue el siguiente: 0 min, 97 % A, 3 % B; 5 min, 97 % A, 3 % B; 10 min, 30 % A, 70 % B; 15 min, 30 % A, 70 % B; 17 min, 97 % A, 3 % B.
- ✚ Ptr + oligonucleótido de cadena doble (dT₁₀ – dA₁₀): columna Acquity UPLC HSS T3 (1.8 μ m; 2.1 x 150 mm; Waters). La fase móvil fue una mezcla de agua con un 0.1 % de ácido fórmico (A) y ACN con un 0.1 % de ácido fórmico (B) a un flujo de 0.3 mL/min. El perfil de elución fue el siguiente: 0 min, 97 % A, 3 % B; 5 min, 97 % A, 3 % B; 10 min, 30 % A, 70 % B; 15 min, 30 % A, 70 % B; 17 min, 97 % A, 3 % B. Temperatura de la columna: 40 °C.



Figura 31. Fotografía del equipo UPLC-QToF-MS.

6.4. COLUMNAS DE SEPHADEX

Para la purificación de las muestras de ADN se emplearon columnas de *sephadex* (disposable PD10 desalting columns sephadex G25, Figura 32). Estas

columnas desechables pre-ensadas contienen partículas de *Sephadex* G25 (85 – 260 μ M). Están diseñadas para purificar de forma rápida y sencilla moléculas de alto peso molecular ($> 5000 M_r$). Se basan en los principios de cromatografía de exclusión molecular, es decir, las moléculas con un tamaño mayor que los poros de la matriz de *sephadex* atraviesan rápidamente la columna y se eluyen primero, mientras que las de menor tamaño, penetran en los poros y salen más tarde. En nuestro estudio las utilizaremos para separar la biomolécula de ADN (intacta o modificada) del fotosensibilizador.



Figura 32. Columnas de sephadex (disposable PD10 desalting columns sephadex G25).

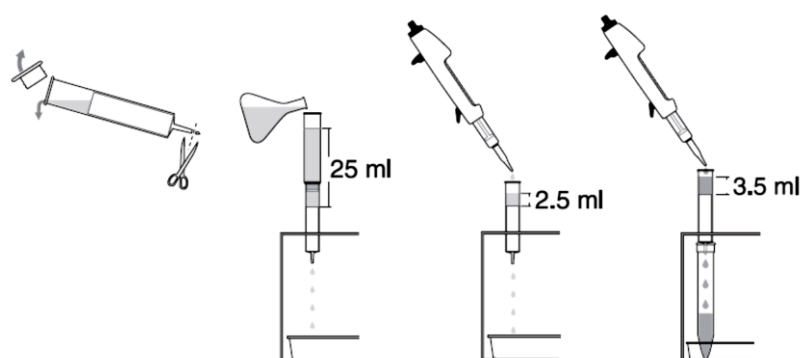


Figura 33. Modo de empleo de las columnas de sephadex (extraído del manual de instrucciones).

El modo de empleo de las columnas de *sephadex* (Figura 33) se detalla a continuación:

- 1) Cortar la parte inferior, retirar la tapa superior y colocar el cartucho en el soporte. Dejar que gotee el exceso de líquido.
- 2) Equilibrar la columna con 25 mL de la disolución tampón de trabajo, en nuestro caso TRIS 10 mM pH 7. Desechar el líquido en la bandeja de descarte.

- 3) Cuando no quede disolución en el cartucho, agregar 2.5 mL de muestra. Dejar que se introduzca completamente en el cartucho y descartar el líquido que gotee durante el proceso.
- 4) Eluir con 3.5 mL de disolución tampón y recoger en un frasco toda la disolución que salga del cartucho hasta que no quede líquido en la parte superior.

7. ANÁLISIS DE LAS DISOLUCIONES. PARTE II

En este capítulo se describirán las técnicas espectroscópicas avanzadas con las que se realizó la caracterización fotofísica de algunos de los productos de las reacciones fotosensibilizadas y que además permitieron obtener información relevante acerca de los mecanismos de reacción involucrados en dichas reacciones. Estas técnicas son la espectroscopía de emisión (estacionaria y con resolución temporal) y la espectroscopía de absorción triplete-triplete por fotólisis de destello láser con resolución temporal.

7.1. ESPECTROSCOPIA DE EMISIÓN

7.1.1. Descripción del equipo

Se realizaron medidas de emisión de fluorescencia, tanto en modo estacionario como con resolución temporal, y de emisión de fosforescencia de $^1\text{O}_2$ a temperatura ambiente en la región del infrarrojo cercano (NIR) con un espectrofluorímetro FluoroLog-3, Horiba Jobin Yvon (Figura 34). El equipo emplea la técnica de recuento de fotones individuales correlacionados temporalmente (TCSPC, *Time-Related Single Photon Counting*). En la Figura 35 se muestra un esquema del equipo FluoroLog FL3-TSCPC-SP de configuración en “X”. Cuenta con:

- ✚ **Fuentes de excitación:** (A-1) lámpara de Xenón estacionaria (CW 450W), (A-2) lámpara de Xenón pulsada (UV *xenon flash tube*) y (B) LEDs pulsados (NanoLEDs de 340 y 460 nm y SpectraLED de 370 y 560 nm).
- ✚ **Monocromadores:** (C) de excitación (330 nm *blaze grating*), (D) de emisión en la región del NIR (1000 nm *blaze grating*) y (E) de emisión para el UV-Visible (iHR320, con dos redes de difracción, 330 y 500 *blaze*).
- ✚ **Detectores:** (F) diodo de referencia para monitorear la intensidad de la lámpara de Xe después de pasar por el monocromador C, (G) R-928 para medidas estacionarias en el UV-Visible (entre 240 - 850 nm), (H) TBX-04 para medidas rápidas en el UV-Visible (entre 182 - 650 nm) e (I) Hamamatsu H10330-45 para medidas en el NIR (entre 950 - 1700 nm).

Esta disposición en “X” con tres monocromadores y tres detectores ofrece gran versatilidad en las medidas, ya que permite registrar la emisión en un rango espectral muy amplio y trabajar con distintas escalas de tiempo.

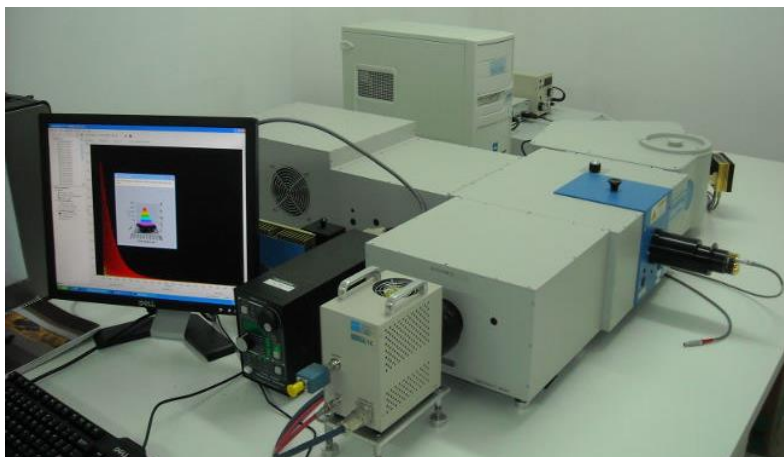


Figura 34. Espectrofluorímetro FluoroMax, Horiba Jobin Yvon.

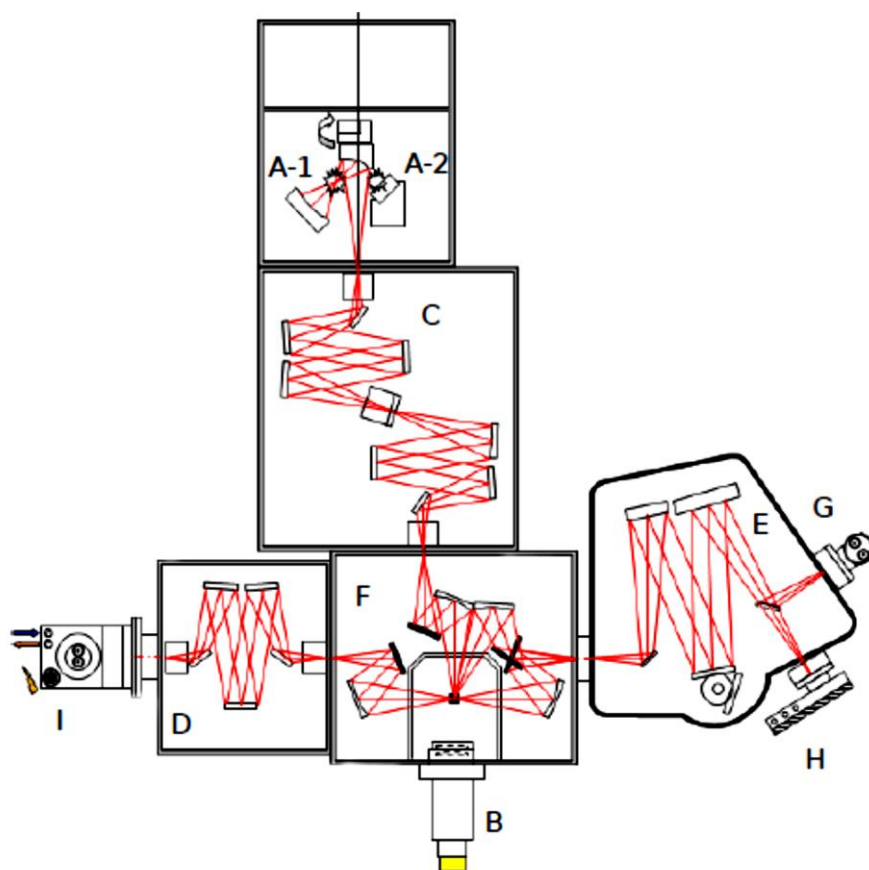


Figura 35. Esquema con la descripción de las partes que componen el espectrofluorímetro FluoroMax, Horiba Jobin Yvon: (A-1) lámpara de Xe estacionaria (CW 450W), (A-2) lámpara de Xe pulsada, (B) LED, (C) monocromador de excitación, (D) monocromador de emisión en la región del NIR, (E) monocromador de emisión UV-Visible, (F) detector de referencia, (G) detector R-928, (H) detector TBX-04 e (I) detector Hamamatsu H10330-45.

7.1.2. Espectros de emisión en estado estacionario

Como vimos en el [Capítulo 1](#), cuando una molécula absorbe radiación pasa a un estado electrónico excitado. Si la pérdida de este exceso de energía ocurre de forma radiativa, se observa la emisión del compuesto. Si la emisión de radiación ocurre sin cambio en la multiplicidad de espín de los estados electrónicos, se observa el fenómeno conocido como emisión de fluorescencia. Si la transición se da entre estados de diferente multiplicidad, se observa emisión de fosforescencia. Este fenómeno queda representado en un espectro de emisión, donde se registra la intensidad de emisión en función de la longitud de onda. Esta propiedad se ve fuertemente afectada tanto por la estructura química de la molécula como por el disolvente en el que se encuentra disuelta [Lakowicz, 2006].

Los espectros de emisión de fluorescencia se registraron utilizando la lámpara de Xe estacionaria (A-1, [Figura 35](#)). La longitud de onda de excitación (λ_{ex}) se seleccionó haciendo pasar el haz de luz proveniente de la lámpara a través de un monocromador (C, [Figura 35](#)). Esta radiación alcanza una de las caras de la celda de cuarzo, donde se encuentra la disolución de la muestra en estudio. Tras la absorción de la luz la muestra emite radiación en todas las direcciones, pero sólo la luz emitida de forma perpendicular a la fuente de excitación es capaz de alcanzar el monocromador de emisión (E, [Figura 35](#)). A la salida de dicho monocromador se encuentra el detector R-928 (G, [Figura 35](#)), donde se registra la radiación emitida a una determinada longitud de onda (λ_{em}). El espectro de emisión se construye excitando a la muestra con una λ_{ex} fija y registrando la señal en un determinado rango de longitudes de onda de emisión. Todos los espectros de emisión se corrigieron por la respuesta del fototubo y del monocromador de emisión.

En algunos casos, tras el registro de los espectros de emisión, se calcularon los rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F). El rendimiento cuántico de un proceso fotofísico hace referencia a la eficiencia de un proceso en términos de cantidad de energía lumínica absorbida. Concretamente, el Φ_F se puede expresar en términos de número de moléculas fluorescentes con respecto al número de fotones absorbidos ([Ecuación 15](#)) [Lakowicz, 2006].

$$\Phi_F = \frac{\text{nº de moléculas fluorescentes por unidad de tiempo y volumen}}{\text{nº de fotones absorbidos por unidad de tiempo y volumen}} \quad \text{Ecuación 15}$$

Como el número de fotones absorbidos es proporcional a la intensidad de la radiación absorbida (I_A) y el número de fotones emitidos por fluorescencia es proporcional a la intensidad de radiación fluorescente (I_F), la ecuación anterior se puede reescribir como sigue:

$$\Phi_F = \frac{I_F}{I_A} \quad \text{Ecuación 16}$$

El Φ_F de una especie molecular se puede determinar de forma experimental (Ecuación 17). Para ello es necesario comparar la intensidad de emisión de la muestra con la intensidad de emisión de una referencia cuyo Φ_F sea conocido. Como muestra de referencia (ref) se utilizó Ptr, la cual tiene un Φ_F de 0.33 ± 0.01 en medio ácido [Lorente, 2006]. La intensidad de emisión (I) se corresponde con el área del espectro de emisión corregido. Es necesario que los espectros de emisión de la muestra y de la referencia se midan exactamente en las mismas condiciones, es decir, misma longitud de onda de excitación, celda, ancho de rendija, temperatura...

$$\Phi_F = \left[\frac{(A_{ref} I n)^2}{(A I_{ref} n_{ref})^2} \right] \Phi_{ref} \quad \text{Ecuación 17}$$

Es conveniente que la absorbancia de la muestra y la referencia sea la misma a la longitud de onda de excitación. En este caso el factor (A_{ref}/A) puede ser simplificado. Si no se consigue tener la misma absorbancia, ese factor sirve para corregir la diferencia de fotones absorbidos entre ambas disoluciones. El término “n” hace referencia al índice de refracción del disolvente. Debido a que todos los experimentos fueron realizados en disoluciones acuosas, el término (n/n_{ref}) también se puede eliminar. Para evitar problemas de filtro interno, en todos los casos se trabajó con disoluciones diluidas con absorbancia igual o menor que 0.10.

7.1.3. Emisión con resolución temporal

En las técnicas con resolución temporal, se aplica un pulso de radiación electromagnética para generar una determinada población de moléculas en estados electrónicamente excitados y, a continuación, se estudia alguna propiedad del sistema en función del tiempo. Para medir el tiempo de vida de fluorescencia (τ_F) de una molécula se debe excitar a la misma con un pulso de luz muy corto y de una longitud de onda determinada, y posteriormente registrar la disminución de la emisión en función del tiempo. La velocidad de este decaimiento se puede expresar con la Ecuación 18 [Lakowicz, 2006],

$$\frac{\partial(N^*)}{\partial t} = -k_F N^* \quad \text{Ecuación 18}$$

donde N^* es la cantidad de moléculas en el estado excitado singlete y k_F es la constante de velocidad de emisión espontánea, que se corresponde con la sumatoria de todas las vías de decaimiento del singlete. La integral definida de la Ecuación 18 entre cero y un tiempo “t”, da como resultado la ecuación Ecuación 19:

$$N_t^* = N_0^* \exp(-k_F t)$$

Ecuación 19

donde N_t^* y N_0^* son el número de moléculas excitadas a un tiempo “t” y a un tiempo “cero” respectivamente. Como la intensidad de fluorescencia es proporcional al número de moléculas en estado excitado, se espera un decaimiento exponencial. Se define el τ_F (Ecuación 20) como el tiempo necesario para que la intensidad de fluorescencia se reduzca en un factor de 1/e de su valor inicial.

$$\tau_F = \frac{1}{k_F}$$

Ecuación 20

Estas medidas se realizaron utilizando como fuente de excitación un NanoLED – 341 (Horiba Jobin Yvon). Los fotones emitidos por la muestra pasan a través del monocromador de emisión a $\lambda_{em} = 450$ nm (E, Figura 35) hasta llegar al detector TBX-04 (H, Figura 35), que se encuentra trabajando en el modo TCSPC. Esta técnica permite detectar de forma individual los fotones que llegan al detector, así como medir sus tiempos de llegada con respecto a una señal de referencia, que por lo general es la fuente de excitación. TCSPC es un método estadístico, y por lo tanto, necesita una fuente de luz pulsada con alta tasa de repetición (como por ejemplo, un LED) para poder acumular un número suficiente de fotones que alcancen el detector, y así, poder generar una buena precisión de los datos. Por razones estadísticas, es imposible asegurar la detección de un único fotón cada vez. Por otra parte, la incidencia de múltiples fotones en el detector también afectará a la estadística y generará medidas erróneas. Para asegurar que se registren los fotones de forma individual, es necesario mantener baja la tasa de emisión en comparación con la tasa de excitación ($\leq 2\%$). El equipo construye un histograma de la distribución de los fotones en el tiempo, lo que es equivalente al decaimiento de fluorescencia.

Para determinar los parámetros cinéticos a partir del decaimiento de fluorescencia hay que tener en cuenta la respuesta temporal del instrumento. Para ello, se registra el perfil temporal de la fuente de excitación (*prompt*) utilizando una muestra que genere gran dispersión de la luz, colocando el monocromador de emisión a la misma longitud de onda que la fuente de excitación y manteniendo el resto de parámetros instrumentales igual que los utilizados en las medidas de la muestra de estudio. El programa utilizado para el análisis de los resultados (DAS6, Horiba Jobin Yvon) realiza una convolución de mínimos cuadrados y calcula una función que se ajusta a los datos del decaimiento. Un buen ajuste genera un valor cercano a uno del parámetro estadístico *chi* cuadrado (χ^2). El método de cálculo del programa permite el uso de funciones multiexponenciales de hasta 5 componentes, siendo monoexponenciales para los casos en los que hay una única especie emisora.

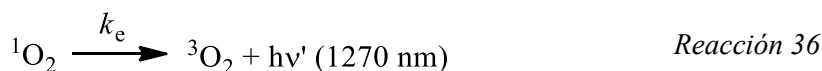
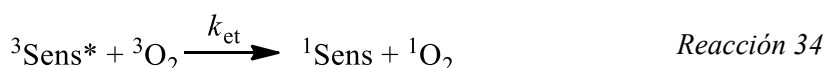
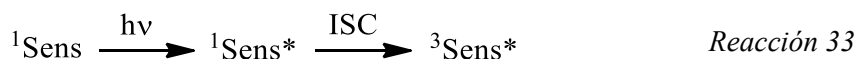
7.1.3.1. Espectros de emisión con resolución temporal

Los espectros de emisión con resolución temporal (TRES) consisten en el registro de los decaimientos de la señal de emisión de fluorescencia en función del tiempo para un rango de longitudes de onda de emisión, a una longitud de onda de excitación fija y durante un tiempo de análisis determinado. Así, se genera una matriz de datos con tres variables: intensidad de emisión (cuentas), tiempo de decaimiento y longitud de onda de emisión.

Se utilizó un NanoLED – 341 (Horiba Jobin Yvon) como fuente de excitación, el monocromador de emisión en el rango UV-Visible (E, Figura 35) y el detector TBX-04 (H, Figura 35), que se encuentra trabajando en el modo TCSPC. El análisis de la matriz global de datos se realizó con el programa del equipo (DAS6), que permite obtener los espectros de emisión de los fluoróforos existentes en la muestra y asociarlos con sus respectivos τ_F .

7.1.4. Oxígeno molecular singlete

El $^1\text{O}_2$ es el estado excitado de menor energía del oxígeno molecular y es un agente fuertemente oxidante. El $^1\text{O}_2$ posee dos electrones apareados (singlete), mientras que el O_2 en estado fundamental tiene dos electrones desapareados (triplete), en sus orbitales moleculares de mayor energía ocupados (HOMO). El $^1\text{O}_2$ se genera fotoquímicamente mediante procesos de transferencia de energía desde una molécula electrónicamente excitada, conocida como fotosensibilizador, al O_2 [Foote, 1991]. El sensibilizador ($^1\text{Sens}$) absorbe radiación y se genera un estado electrónico excitado singlete ($^1\text{Sens}^*$). Tras un cruce de sistemas se forma el estado electrónico excitado triplete ($^3\text{Sens}^*$) de mayor tiempo de vida (Reacción 33). $^3\text{Sens}^*$ puede transferir su exceso de energía hacia el oxígeno molecular ($^3\text{O}_2$) disuelto en el medio (Reacción 34). La desactivación de $^1\text{O}_2$ puede ocurrir a través de diferentes vías. Las Reacciones 35 y 36 muestran cómo el $^1\text{O}_2$ puede desactivarse de forma no radiativa transfiriendo su exceso de energía al disolvente o de forma radiativa, con la consecuente emisión de luz. En presencia de un desactivador de estados excitados (Q), puede darse tanto la desactivación química (Reacción 37) como la física (Reacción 38).





La detección de esta especie reactiva de oxígeno se fundamenta en la medida de su luminiscencia característica, con una $\lambda_{\text{máx}}$ a 1270 nm, cuando se irradia de forma continua una disolución que contiene $^1\text{O}_2$ [Krasnovsky, 1979; Kahn, 1980]. En estos experimentos se trabaja con agua deuterada en lugar de con agua, ya que las frecuencias vibracionales de los enlaces D-O en la molécula D_2O disminuyen con respecto a los enlaces H-O de la molécula H_2O , y por lo tanto, la velocidad de desactivación se reduce en aproximadamente un orden de magnitud. Por consiguiente, el tiempo de vida aumenta desde 3 – 4 μs en H_2O a 62 μs en D_2O [Ogilby, 1983; Foote, 1995; Martínez, 2000]. Esto incrementa considerablemente la sensibilidad del método obteniendo señales lumínicas superiores. El pD (-log $[\text{D}^+]$, D = deuterio) de las disoluciones se ajustó tal y como se ha descrito en el [Apartado 5.2](#) de esta sección, pero sustituyendo NaOH y HCl por sus correspondientes disoluciones deuteradas. El valor equivalente de pH se calculó teniendo en cuenta la siguiente ecuación:

$$pD = pH + 0.4 \quad \text{Ecuación 21}$$

Para la realización de las medidas de detección de $^1\text{O}_2$ se utilizó como fuente de excitación la lámpara de Xe estacionaria (A-1, [Figura 35](#)), el monocromador de emisión de la región NIR (D, [Figura 35](#)) y el detector Hamamatsu H10330-45 (I, [Figura 35](#)).

El rendimiento cuántico de generación de $^1\text{O}_2$ (Φ_{Δ}) se puede definir como la cantidad de moléculas de $^1\text{O}_2$ generadas por cada cuanto de luz absorbido por el fotosensibilizador. Bajo irradiación continua y teniendo en cuenta las [Reacciones 33 a 38](#) planteadas en el inicio de este apartado, se puede escribir la siguiente expresión:

$$[^1\text{O}_2] = \frac{\Phi_{\Delta} I_A}{k_d + (k_q + k_r) [\text{Sens}]} \quad \text{Ecuación 22}$$

En la [Ecuación 22](#), I_A es la intensidad de radiación absorbida por el fotosensibilizador, y el producto de Φ_{Δ} con dicha intensidad hace referencia a la velocidad de generación de $^1\text{O}_2$ ([Reacciones 33 y 34](#)). La contribución de la [Reacción 36](#) se puede despreciar debido a que k_e es mucho menor que k_d . Si se considera que el propio sensibilizador puede actuar como una especie desactivadora de estados excitados, se deben tener en cuenta las [Reacciones 37 y 38](#), donde se ha sustituido “Q” por “Sens”.

La señal obtenida con el equipo (Se) es proporcional a la cantidad de $^1\text{O}_2$ generado, y está relacionada con las características del equipo, del sensibilizador y del medio. Esto queda reflejado en la siguiente ecuación:

$$Se = C k_e (1/n^2) [^1O_2] = C k_e (1/n^2) \frac{P_0 (1 - 10^{-A}) \Phi_{\Delta}}{k_d + (k_q + k_r) [Sens]} \quad \text{Ecuación 23}$$

Donde C es un factor de proporcionalidad que engloba la geometría y factores electrónicos del sistema de detección, k_e es la constante de desactivación radiativa de 1O_2 , n es el índice de refracción del medio, P_0 es la tasa de fotones incidentes y A es la absorbancia del sensibilizador a la longitud de onda de excitación. Por lo tanto, el producto $P_0 (1 - 10^{-A})$ hace referencia a la tasa de fotones absorbidos por el fotosensibilizador, es decir, $I_A \Phi_{\Delta}$ es el rendimiento cuántico de generación de 1O_2 del sensibilizador y k_d , k_q y k_r son las constantes de desactivación no radiativa, de desactivación química y de desactivación física de 1O_2 .

Como referencia se utilizó Ptr, que tiene un Φ_{Δ} conocido de 0.18 ± 0.02 en medio ácido [Lorente, 2006]. Por lo tanto, la relación entre las señales de emisión fosforescente de 1O_2 de la muestra y la referencia es proporcional a la relación de sus Φ_{Δ} :

$$\frac{Se}{Se^{ref}} = \frac{\Phi_{\Delta}}{\Phi_{\Delta}^{ref}} \frac{k_d^{ref} + k_T^{ref} [Sens^{ref}]}{k_d + k_T [Sens]} \frac{P_0 (1 - 10^{-A})}{P_0 (1 - 10^{-A_{ref}})} \quad \text{Ecuación 24}$$

Debido a que los términos C, n y k_e se mantienen constantes en ambas medidas, se pueden simplificar. El superíndice “ref” representa a los parámetros de la referencia y k_T es la constante bimolecular de desactivación total de 1O_2 por el fotosensibilizador, es decir, la suma de las constantes de desactivación química y física. Como la longitud de onda de excitación es la misma para la muestra y para la referencia, se puede simplificar el término de la intensidad de luz incidente. Las disoluciones de las muestras en estudio y de Ptr se llevaron a la misma absorbancia a la longitud de onda de excitación y al mismo pD para conseguir disoluciones ópticamente comparables, por lo que también se puede simplificar el término que hace referencia a la absorbancia de los compuestos. Por lo tanto, si reorganizamos la Ecuación 24:

$$\Phi_{\Delta} = \Phi_{\Delta}^{ref} \frac{Se}{Se^{ref}} \frac{k_d^{ref} + k_T^{ref} [Sens^{ref}]}{k_d + k_T [Sens]} \quad \text{Ecuación 25}$$

En el caso de que no se conozca k_T , se determina un rendimiento cuántico aparente (Φ_{Δ}^{ap}) con la Ecuación 26:

$$\Phi_{\Delta}^{ap} = \Phi_{\Delta}^{ref} \frac{Se}{Se^{ref}} \quad \text{Ecuación 26}$$

7.1.5. Titulación espectrofluorimétrica

Se utilizará esta técnica con el fin de obtener más información sobre los equilibrios ácido-base en los que están involucrados los estados electrónicos excitados. Concretamente, se utilizará para calcular los valores de las constantes de disociación de dicho equilibrio (K_a^*). La titulación espectrofluorimétrica se basa en el análisis de la variación de I_F de una disolución de la sustancia en estudio cuando se realizan variaciones de pH de la misma. Los resultados registrados se ajustarán con la Ecuación 27 para obtener el valor de K_a^* [Thomas, 2002, b].

$$I_F = I_a + (I_b - I_a) \frac{K_a^*}{K_a^* + [H^+]} \quad \text{Ecuación 27}$$

I_a e I_b son las intensidades de emisión de fluorescencia de las formas ácida y básica respectivamente.

7.2. FOTÓLISIS DE DESTELLO LÁSER

La técnica de fotólisis de destello láser (LFP, por sus siglas en inglés *Laser Flash Photolysis*) fue desarrollada por Porter y Norris en 1949. Desde entonces ha sido una herramienta básica para el estudio de las propiedades fotoquímicas y fotofísicas de numerosos compuestos. Los experimentos de LFP permiten la observación directa de especies transitorias para su estudio espectroscópico y cinético. Por lo general, se aplica un pulso de luz intenso y de corta duración para formar una concentración suficiente de la especie transitoria de interés y así poder observar sus propiedades espectroscópicas [Bourdelande, 1999].

7.2.1. Fundamento teórico

En las diferentes etapas que se dan en los experimentos de LFP se observan distintas transiciones entre los estados excitados (Figura 36). Inicialmente, la molécula se encuentra en su estado de mínima energía, es decir, en el estado fundamental (S_0). Tras la excitación con el pulso del láser, se genera una alta población de especies en el estado excitado (S_1). A continuación, una parte de esa población sufre un ISC, generando los estados excitados triplete (T_1). Por otra parte, estas moléculas en estado excitado triplete también pueden absorber radiación. Esto quiere decir que presentan un espectro de absorción ($T_1 \rightarrow T_n$) diferente al de las moléculas en el estado fundamental ($S_0 \rightarrow S_n$).

Por lo general, los sistemas de LFP son espectrómetros de haz simple pero se comportan como instrumentos de doble haz. Los haces de la muestra y de la referencia se separan en el tiempo, en lugar de en el espacio. Así, la señal de la referencia se obtiene antes de que se produzca la excitación con el láser,

obteniendo el valor de P_0 . La absorbancia a un tiempo “t”, después del pulso del láser, vendrá dada por la siguiente ecuación:

$$\Delta A = -\log \left(\frac{P_t}{P_0} \right) \quad \text{Ecuación 28}$$

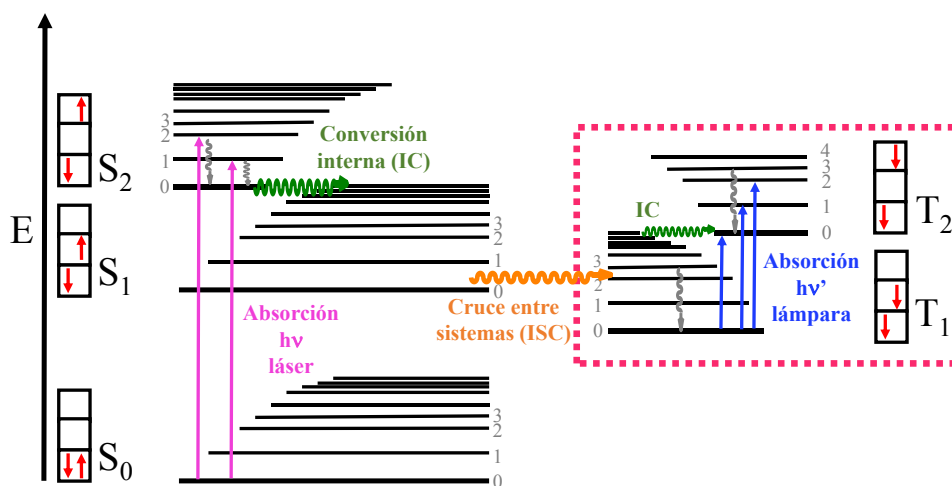


Figura 36. Diagrama de Jablonski modificado. El recuadro punteado resalta la transición triplete-triplete que tiene lugar durante los experimentos de LFP.

7.2.2. Descripción del equipo

Los experimentos de LFP se realizaron con un equipo LP980 (*Edinburgh Instruments*, Figura 37) acoplado a un osciloscopio digital 300 MHz Tektronix TDS3012C para la adquisición de las señales. El equipo cuenta con un láser Surelite II-10 de Nd:YAG, cuyo haz de salida fundamental de 1064 nm se triplica generando tres armónicos. En todos los experimentos se excitó con el tercer armónico a 355 nm. La duración del pulso del láser es de 6 ns y tiene una energía de 10 mJ por pulso. Los haces de luz del láser y de la lámpara de análisis se disponen a 90°, tal y como se ve en el Esquema 8. La lámpara de análisis es una lámpara de arco de Xe de 150 W libre de ozono, cuyo haz se enfoca en el monocromador (TMS 302, *Czerny-Turner*) tras atravesar la muestra. Por último, el haz llega al fotomultiplicador (PMT LP) para registrar la señal.

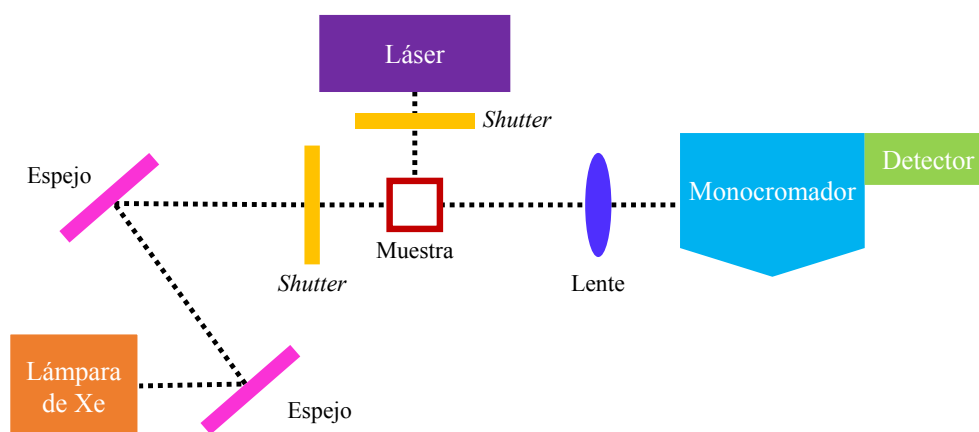
7.2.3. Decaimientos y espectros de especies transitorias

Se prepararon mezclas acuosas de Ptr y los compuestos en estudio con una absorbancia entre 0.3 y 0.4 a la longitud de onda de excitación. En todos los casos se trabajó a pH 5.5 y en condiciones anaeróbicas. Se registraron los espectros de

absorbancia antes y después de cada medida para controlar que no hubiera fotodegradación de la muestra.



Figura 37. Fotografía del sistema de detección del equipo de fotólisis de destello láser utilizado.



Esquema 8. Esquema del equipo de láser utilizado.

Se realizaron dos tipos de medidas. En una de ellas se realizaba un registro de la señal en función del tiempo a una longitud de onda determinada (decaimiento), mientras que en la otra, se registraba la señal en función del tiempo para un determinado rango de longitudes de onda (espectro de absorbancia de la especie transitoria). Para evitar la degradación de la muestra, se agitaba cada un número determinado de disparos (aproximadamente cada 25).

El ajuste exponencial de los decaimientos permite calcular los τ_T . Si se registran los decaimientos de $^3\text{Ptr}^*$ en presencia de diferentes concentraciones de sustrato y se obtienen los correspondientes τ_T , se puede determinar la constante de desactivación de $^3\text{Ptr}^*$ (k_t) aplicando la ecuación de Stern Volmer (Ecuación 29). El análisis de las señales se realizó con el programa OriginPro 8.5 de *OriginLab Corporation*.

$$\frac{\tau_T^0}{\tau_T} = 1 + k_t \times \tau_T^0 \times [Q] \quad \text{Ecuación 29}$$

iii) RESULTADOS

8. FOTOSENSIBILIZACIÓN DE TIMIDINA INDUCIDA POR PTERINA EN PRESENCIA DE OXÍGENO

Como se detalló en la introducción ([Apartado 2.4](#)), numerosos estudios demuestran que la excitación directa de Thy por absorción de radiación UV genera CPD y 6,4-fotoproductos [Banyasz, 2011; Cadet, 2015], fuertemente relacionados con procesos de mutagénesis y carcinogénesis [Harm, 1980]. Sin embargo, a pesar de que estos productos también se pueden formar a través de un proceso fotosensibilizado con radiación UV-A, como resultado de un mecanismo de transferencia de energía [Cadet, 2005], los estudios acerca de reacciones fotosensibilizadas por sensibilizadores endógenos y exógenos son más escasos. La reactividad de las bases del ADN frente a un sensibilizador que actúa mediante un mecanismo de transferencia electrónica depende de los correspondientes potenciales de oxidación. Para los nucleótidos varían en orden creciente de la siguiente forma: dGMP < dAMP < dCMP \approx dTMP, y por lo tanto, se acepta que los nucleótidos pirimidínicos son más difíciles de oxidar que los púricos. Menadiona [Decarroz, 1986] y benzofenona [DelaTour, 1998] son capaces de fotooxidar a la base de Thy en diferentes sustratos a través de un mecanismo Tipo I. En trabajos previos del grupo de investigación se demostró que Ptr, compuesto modelo de las pterinas oxidadas, era capaz de fotoinducir daño a dTMP en disoluciones acuosas bajo irradiación UV-A [Serrano, 2016].

El objetivo del presente capítulo es investigar si dT es susceptible de sufrir algún daño a través de un proceso fotosensibilizado por Ptr. La única diferencia estructural entre dTMP y dT es que la primera contiene un grupo fosfato unido al carbono 5' de la ribosa ([Apartado 2.1](#)). Estudios previos demostraron que el fosfato, entre otros aniones, desactiva el estado excitado singlete de Ptr en disolución acuosa [Lorente, 2004]. Por ello, se pretende evaluar si este grupo juega algún papel en la reacción fotoquímica cuando se encuentra unido covalentemente al sustrato.

Se realizaron experimentos de irradiación continua bajo diferentes condiciones experimentales utilizando Ptr como sensibilizador y dT como sustrato. Las disoluciones se analizaron antes y después de la irradiación con HPLC-PDA y HPLC-FL. Además, se realizaron experimentos de desactivación de fluorescencia, tanto en estado estacionario como resuelto en el tiempo, y de LFP para evaluar la participación de los estados excitados con el sustrato. El análisis de los resultados permitirá dilucidar el mecanismo de reacción y por último, se identificaron los productos con la técnica UPLC-MS/MS.

8.1. PTERINA COMO FOTSENSIBILIZADOR DE TIMIDINA

Se prepararon mezclas de Ptr y dT a pH 5.5, para asegurar que el 99 % del fotosensibilizador se encuentra en la forma ácida. Las disoluciones equilibradas en aire se irradiaron con lámparas Rayonet a 350 nm ([Sistema de irradiación I](#)) durante diferentes tiempos. A dicha longitud de onda la única especie que absorbe radiación es Ptr, ya que dT no presenta absorbancia en esta región del espectro ([Apartado 2.1.1](#)).

La evolución temporal de los reactivos y productos se siguió por el HPLC. En la [Figura 38](#) pueden observarse los cromatogramas de la disolución antes (línea morada) y después de 4 horas (línea naranja) de irradiación. Los picos cromatográficos correspondientes a Ptr y dT aparecen a un tiempo de retención de 4.9 y 6.1 minutos, respectivamente. El área de los picos de ambos reactivos disminuye con el tiempo de irradiación, y también, se observa la aparición de nuevos picos a menores tiempos de retención. A partir de curvas de calibración de los reactivos se obtuvieron los perfiles de concentración en función del tiempo de irradiación. El sustrato se consume más de un 40 % en 5 horas de irradiación ([Figura 39.a](#)).

Como era de esperar, también disminuye la concentración de Ptr con el tiempo de irradiación ([Figura 39.b](#)). Estudios previos sobre la fotoquímica de Ptr demostraron que bajo irradiación UV-A y en presencia de O₂, la molécula experimenta una fotooxidación, con la consecuente ruptura del anillo y la generación de productos no pterínicos [[Cabrerizo, 2004](#)]. Esta reacción es relativamente lenta si se compara con la fotooxidación de otros derivados de la familia y sólo tiene lugar si el O₂ está presente en el medio de reacción. Debido a que los experimentos de fotosensibilización de dT se realizaron en condiciones de irradiación intensas y durante largos periodos de tiempo, fue necesario evaluar la fotodegradación del fotosensibilizador en estas condiciones. Para realizar este estudio, se irradiaron disoluciones de Ptr en presencia y en ausencia de dT y se compararon los perfiles de concentración del fotosensibilizador obtenidos por HPLC ([Figura 40](#)). El consumo de Ptr es menor en presencia de dT que en su ausencia. Esto se debe a que cuando dT se encuentra en el medio, aumenta el número de reacciones que compiten con la oxidación de Ptr y por lo tanto, su consumo es menor. Estas vías pueden ser desactivaciones físicas o químicas de los estados excitados. Este control permite afirmar que el consumo de Ptr registrado durante el experimento de fotosensibilización de dT en presencia de O₂ se debe a la propia fotoquímica del sensibilizador, es decir, no está relacionado con la reacción fotosensibilizada.

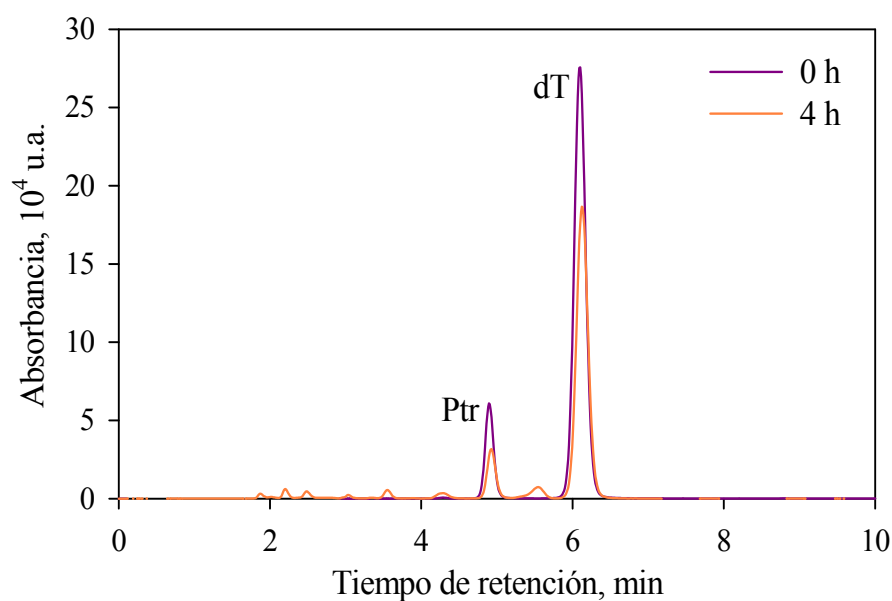


Figura 38. Cromatogramas a 280 nm de una mezcla de Ptr y dT equilibrada en aire antes (línea morada) y después de 4 horas de irradiación (línea naranja). $[Ptr]_0 = 112 \mu\text{M}$, $[dT]_0 = 580 \mu\text{M}$, $\text{pH} = 5.5 \pm 0.1$.

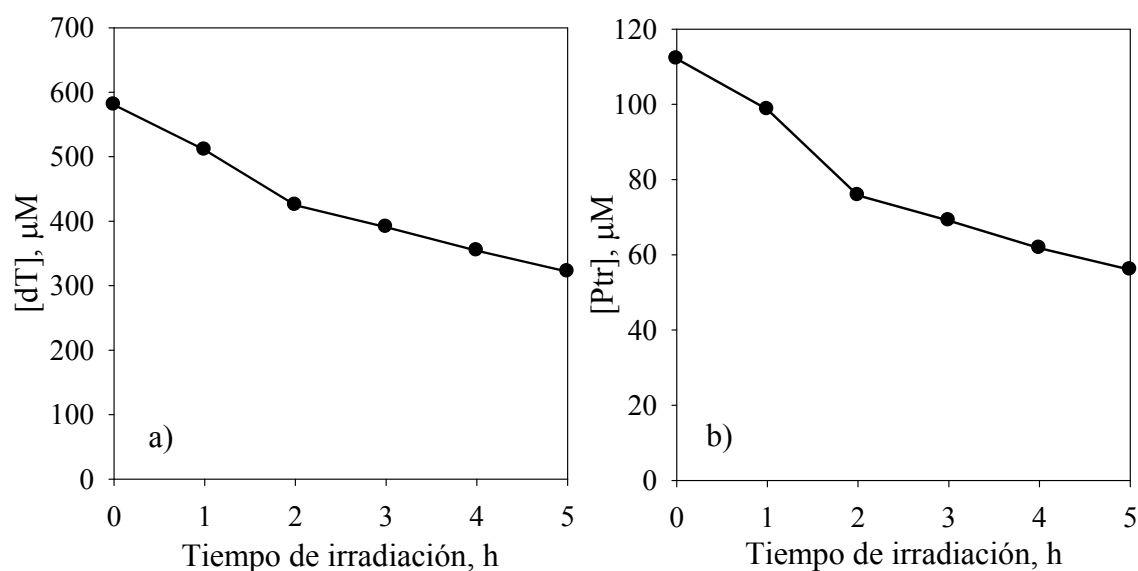


Figura 39. Evolución de las concentraciones de dT (a) y Ptr (b) con el tiempo de irradiación de las mezclas equilibradas con aire. $[Ptr]_0 = 112 \mu\text{M}$, $[dT]_0 = 580 \mu\text{M}$, $\text{pH} = 5.5 \pm 0.1$.

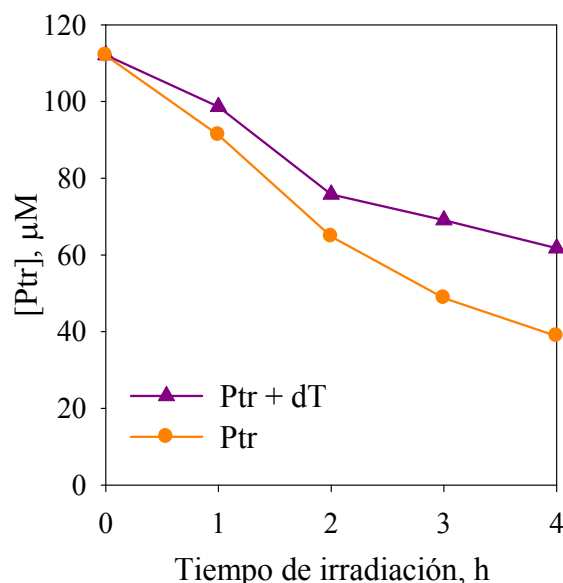


Figura 40. Evolución temporal de la concentración de Ptr en presencia (línea morada) y en ausencia (línea naranja) de dT. Irradiación de disoluciones equilibradas con aire. $[Ptr]_0 = 112 \mu\text{M}$, $[dT]_0 = 580 \mu\text{M}$, $\text{pH} = 5.5 \pm 0.1$.

Se realizaron los siguientes controles:

- Para descartar reacciones de fotooxidación de dT por absorción directa de radiación UV-A, se irradió una disolución acuosa de dT equilibrada en aire a pH 5.5 durante diferentes tiempos. El análisis con HPLC (Figura 41.a) reveló que la concentración del nucleósido permanece invariable al menos durante 4 horas de irradiación, indicando que no se producen cambios químicos en la molécula. Este resultado es completamente lógico, ya que dT no absorbe radiación a longitudes de onda mayores a 300 nm. Sin embargo, al trabajar a altas concentraciones de nucleósido, es necesario descartar cualquier efecto debido a la absorción directa de radiación.
- Para descartar reacciones térmicas entre el sensibilizador y el sustrato, se mantuvieron en la oscuridad mezclas de ambos compuestos con concentraciones similares a las empleadas en los experimentos de fotosensibilización. Durante las cuatro horas de incubación no se produjo ningún cambio en la concentración de los reactivos (Figura 41.b), permitiendo descartar cualquier tipo de reacción térmica dentro de esa ventana de tiempo.

8.1.1. Evaluación de la participación de O_2 en la reacción fotosensibilizada

Con el objetivo de evaluar la participación del O_2 en el proceso fotosensibilizado, se realizaron experimentos comparativos irradiando una

disolución de Ptr y dT en presencia y en ausencia de O_2 . A modo de control se irradiaron disoluciones de Ptr en las mismas condiciones, pero en ausencia de sustrato. La **Figura 42** muestra la evolución temporal de la concentración de los reactivos en función del tiempo de irradiación. El principal efecto en ausencia de O_2 es la disminución de la velocidad de consumo del nucleósido. Sin embargo, en estas condiciones hay un consumo considerable del fotosensibilizador, si tenemos en cuenta que en ausencia de dT no hay consumo de Ptr, al igual que ocurría cuando se utilizaba dTMP como sustrato [Serrano, 2016]. Este aspecto no se había observado previamente con las otras bases del ADN. Este proceso fotosensibilizado en condiciones anaeróbicas se estudiará con más detalle en el **Capítulo 9**.

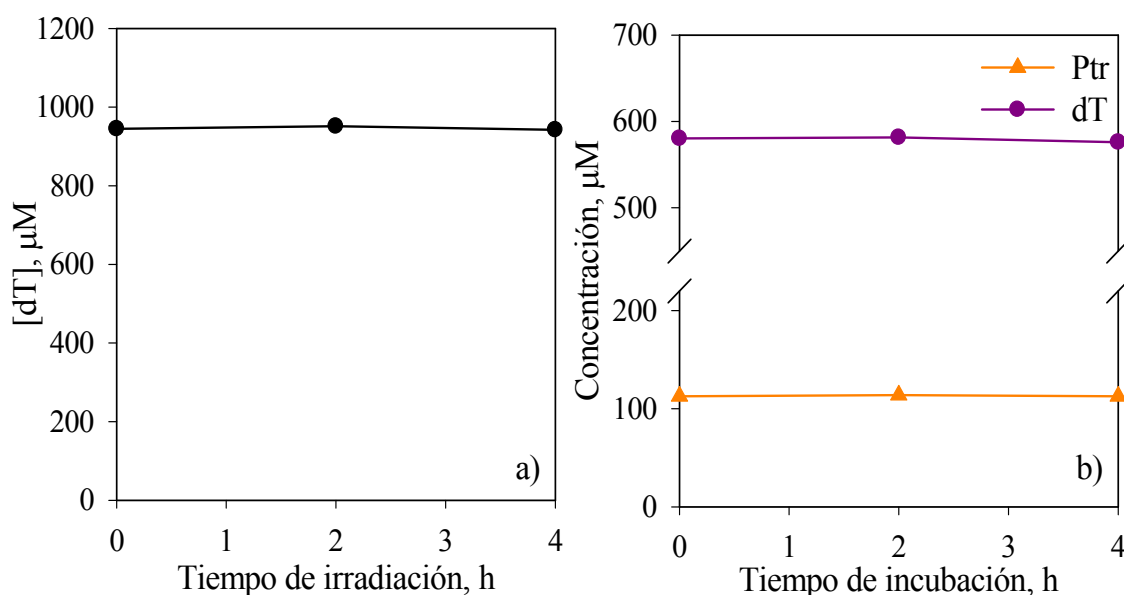


Figura 41. a) Concentración de dT en función del tiempo de una disolución del nucleósido equilibrada en aire e irradiada durante diferentes periodos de tiempo. $[dT]_0 = 945 \mu M$, $pH = 5.5 \pm 0.1$; b) Concentraciones de Ptr (línea naranja) y dT (línea morada) en función del tiempo de incubación. $[Ptr]_0 = 112 \mu M$, $[dT]_0 = 580 \mu M$, $pH = 5.5 \pm 0.1$.

Estos resultados indican que dTMP y dT muestran el mismo comportamiento cuando se exponen a radiación UV-A en presencia de Ptr, indicando que el grupo fosfato no juega un papel importante en la reacción fotosensibilizada [Serrano, 2016]. En ambos casos se puede pensar en la existencia de dos procesos fotosensibilizados paralelos en función de la concentración de O_2 . Por una parte, el que tiene lugar en presencia de O_2 es el responsable del consumo de dT pero no del sensibilizador, ya que Ptr sólo se consume debido a su fotooxidación y no por la participación en la reacción fotosensibilizada. El que no precisa de O_2 lleva asociado un menor consumo del sustrato, pero el sensibilizador se consume apreciablemente. Este consumo de Ptr no se debe a su propia fotoquímica, ya que

cuando se irradia Ptr en ausencia de dT en condiciones anaeróbicas, la concentración de Ptr permanece invariable.

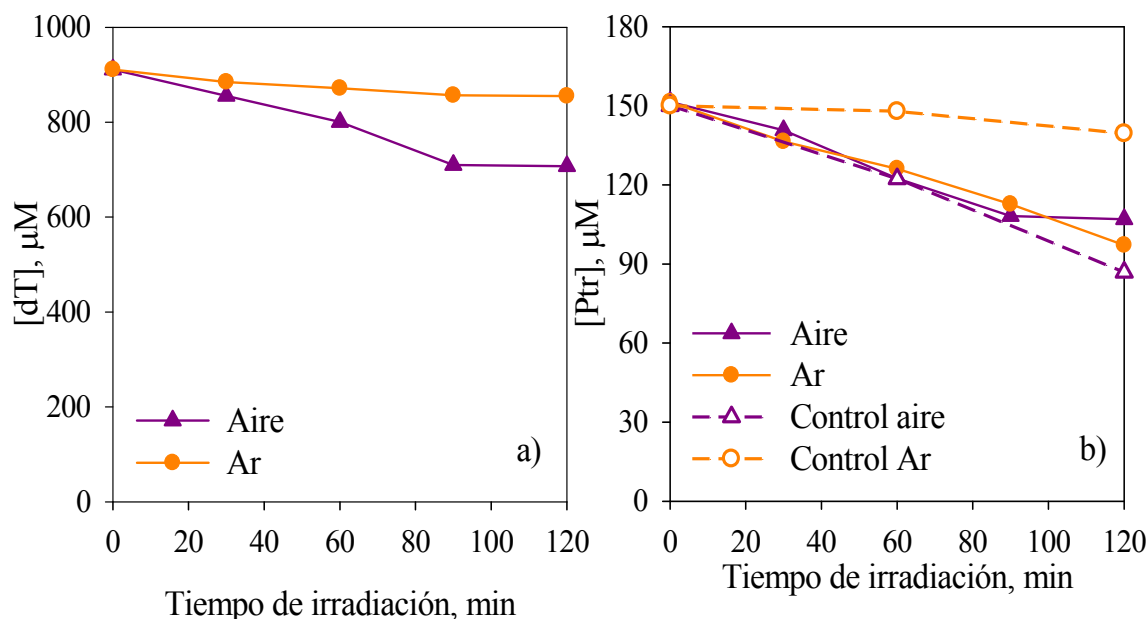


Figura 42. Evolución temporal de la concentración de dT (a) y Ptr (b) bajo irradiación UV-A de una mezcla de ambos en presencia y en ausencia de O_2 . $[Ptr]_0 = 150 \mu\text{M}$; $[dT]_0 = 900 \mu\text{M}$; $\text{pH} = 5.5 \pm 0.1$.

8.2. INTERACCIÓN DE LOS ESTADOS EXCITADOS DE PTERINA CON TIMIDINA

En esta sección se presenta un estudio de la interacción de $^1\text{Ptr}^*$ y $^3\text{Ptr}^*$ con dT mediante estudios de desactivación de la emisión de fluorescencia, tanto en estado estacionario como resuelto en el tiempo, y experimentos de LFP.

8.2.1. Desactivación del estado excitado singlete

Los experimentos se realizaron con el espectrofluorímetro FluoroLog-3, Horiba Jobin Yvon (Figura 34). Como fuente de excitación se utilizó la lámpara de Xe (A-1, Figura 35) en los estudios de estado estacionario y un NanoLED ($\lambda_{\text{ex}} = 341 \text{ nm}$) en los experimentos resueltos en el tiempo.

Se analizaron disoluciones que contenían una concentración fija de Ptr (17 μM) y concentraciones crecientes de dT (0 – 42 mM). Se registraron los espectros de emisión excitando a 350 nm y registrando la emisión entre 380 y 540 nm (Figura 43). Se integraron los espectros de emisión para cada concentración de nucleósido, obteniendo el valor de I_F . Se observó una importante desactivación de la fluorescencia, lo que indica que existe una interacción entre $^1\text{Ptr}^*$ y dT. Con las

I_F obtenidas se realizó un análisis de Stern-Volmer y se obtuvo la correspondiente k_q (ver más abajo).

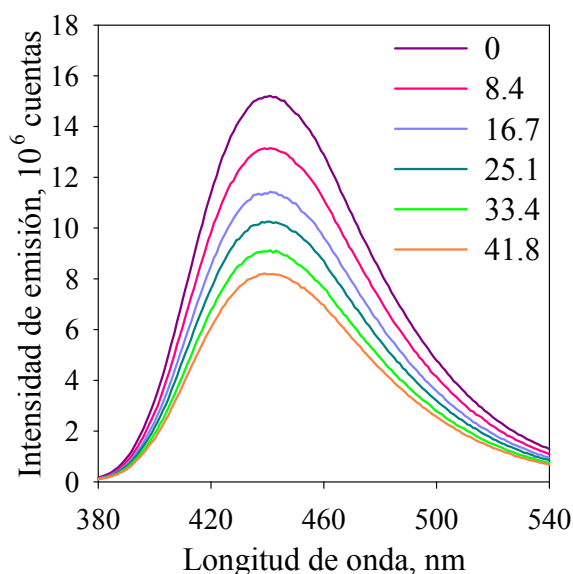


Figura 43. Espectros de emisión de fluorescencia de disoluciones con concentración fija de Ptr y concentraciones crecientes de dT. $[Ptr] = 17 \mu M$, $[dT] = 0 - 42 \text{ mM}$, $pH = 5.5 \pm 0.1$.

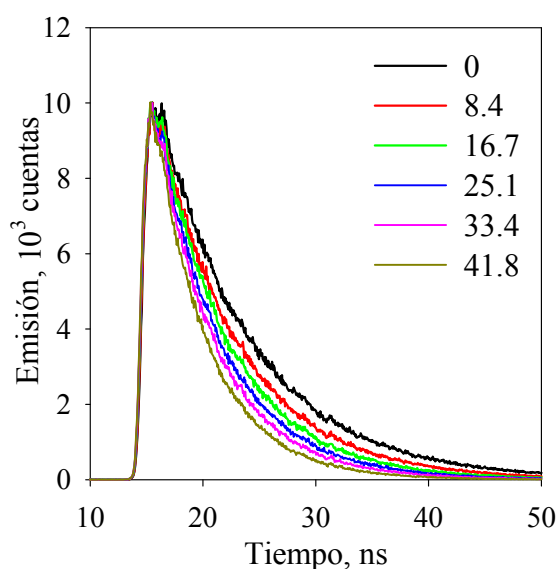


Figura 44. Decaimientos de emisión de fluorescencia de una disolución con concentración fija de Ptr y concentraciones crecientes de dT. $[Ptr] = 17 \mu M$, $[dT] = 0 - 42 \text{ mM}$, $pH = 5.5 \pm 0.1$.

Paralelamente, se registraron los decaimientos de la emisión de Ptr ($\lambda_{em} = 450 \text{ nm}$) en disoluciones con diferentes concentraciones de dT. En la Figura 44 se puede observar que todos los decaimientos registrados presentan un comportamiento monoexponencial. Se realizó el ajuste de las curvas para obtener

el τ_F a cada concentración de nucleósido y con ello se realizó el análisis de Stern-Volmer.

La Figura 45 muestra las gráficas de Stern-Volmer de los experimentos en estado estacionario y resuelto en el tiempo de la desactivación de la fluorescencia de $^1\text{Ptr}^*$ por dT. Tanto I_F^0/I_F como τ_F^0/τ_F presentan una dependencia lineal con la concentración de nucleósido, indicando que la desactivación es exclusivamente dinámica y no estática. A partir del ajuste de ambas rectas se calculó k_q utilizando la Ecuación 10. Los valores de k_q para la desactivación de $^1\text{Ptr}^*$ por dT en estado estacionario y resuelto en el tiempo son $2.6 (\pm 0.5) \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $2.0 (\pm 0.2) \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ respectivamente, encontrándose dentro del orden difusional. El resultado es similar al obtenido con dCMP y dTMP [Petroselli, 2009; Serrano, 2014].

Sin embargo, las concentraciones de nucleósido que generan una desactivación significativa son superiores a las utilizadas en los experimentos de fotosensibilización y por lo tanto, la desactivación de $^1\text{Ptr}^*$ por dT fue muy baja (menor del 2 %). No obstante, no se puede descartar por completo la participación de esta especie en la reacción fotosensibilizada.

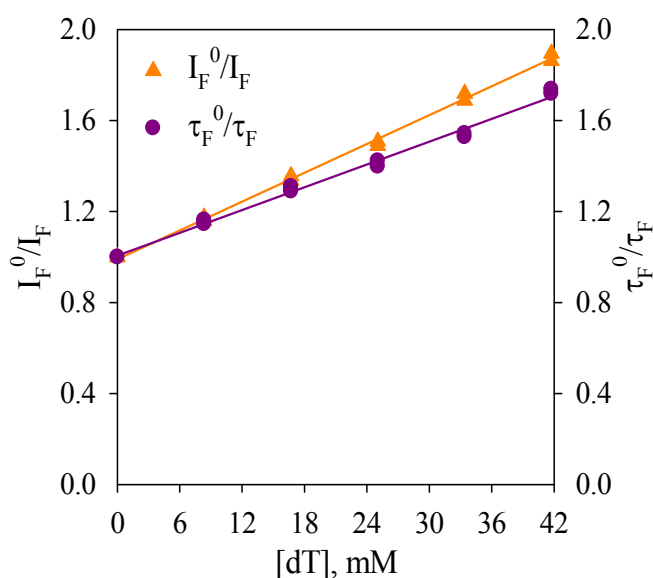


Figura 45. Gráficos Stern-Volmer de la desactivación de $^1\text{Ptr}^*$ por dT a pH 5.5 para experimentos en estado estacionario y resueltos en el tiempo.

8.2.2. Desactivación de los estados excitados tripletes

Para estudiar la interacción de $^3\text{Ptr}^*$ con dT y determinar su constante de desactivación, se plantearon experimentos de LFP. En el estudio se utilizaron disoluciones con una concentración constante del sensibilizador ($88 \mu\text{M}$) y concentraciones crecientes del nucleósido ($0 - 36 \text{ mM}$). Las disoluciones se burbujearon durante 20 minutos con Ar para eliminar el O_2 del medio. Se registraron los decaimientos de $^3\text{Ptr}^*$ para cada concentración de dT (Figura 46) y se procesaron las señales para obtener los tiempos de vida correspondientes (τ_T).

Con la pendiente obtenida de la gráfica Stern-Volmer (Figura 47) y aplicando la Ecuación 29, se calculó la constante de desactivación de $^3\text{Ptr}^*$ por dT.

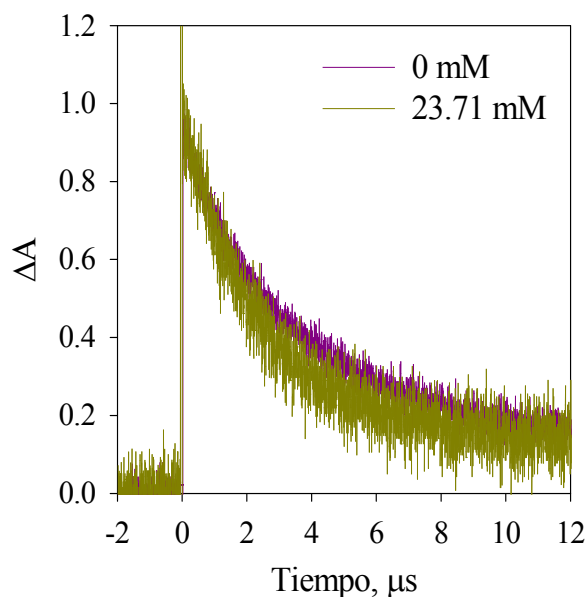


Figura 46. Decaimientos de $^3\text{Ptr}^*$, normalizados a ΔOD obtenido justo después del disparo del láser, de una disolución de Ptr en presencia y en ausencia de dT. $[\text{Ptr}] = 88 \mu\text{M}$, $[\text{dT}] = 23.71 \text{ mM}$, $\text{pH} = 5.5 \pm 0.1$.

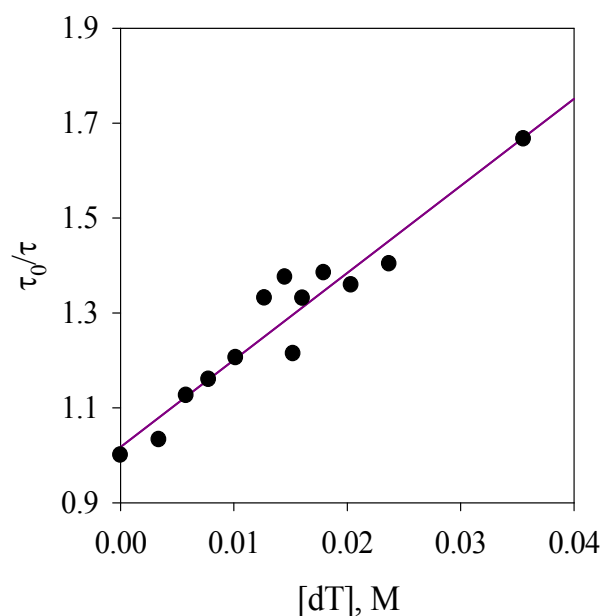


Figura 47. Gráfico Stern-Volmer de la desactivación de $^3\text{Ptr}^*$ por dT a $\text{pH} 5.5 \pm 0.1$.

El valor de k_t obtenido fue de $5.3 (\pm 0.3) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, que es significativamente inferior al de dTMP ($1.5 (\pm 0.3) \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [Serrano, 2014]. Esta diferencia puede deberse a la presencia del fosfato en el nucleótido. Sin

embargo, no se encontraron diferencias en las constantes de desactivación de $^1\text{Ptr}^*$ por dT y dTMP.

8.3. ANÁLISIS MECANÍSTICO DEL PROCESO

8.3.1. Papel del O_2

Se realizaron experimentos de fotosensibilización en condiciones de saturación de O_2 . Para ello, se prepararon mezclas de Ptr y dT a pH 5.5, se burbujearon con O_2 durante 20 minutos y se irradiaron diferentes periodos de tiempo. El consumo de los reactivos se siguió con HPLC y se comparó con el obtenido empleando disoluciones idénticas, pero equilibradas en aire. La Figura 48 muestra que la velocidad de consumo de dT disminuye al aumentar la concentración de O_2 .

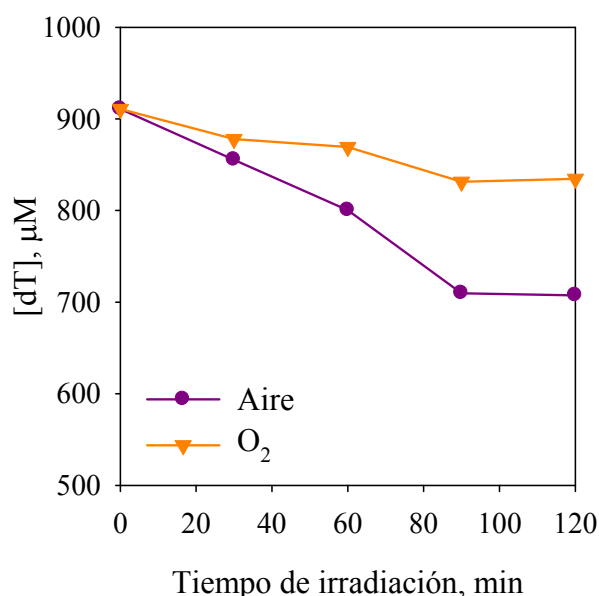


Figura 48. Evolución de la concentración de dT en función del tiempo de irradiación de disoluciones de Ptr y dT equilibradas en aire (línea morada) y en O_2 (línea naranja). $[\text{Ptr}]_0 = 150 \mu\text{M}$, $[\text{dT}]_0 = 1 \text{ mM}$, $\text{pH} = 5.5 \pm 0.1$.

Este resultado puede parecer contradictorio, ya que, al aumentar la concentración de O_2 , aumenta la concentración de EROs. Por lo tanto, si el consumo de dT es consecuencia de su reacción con EROs, su velocidad de consumo debería ser igual o mayor que la obtenida con disoluciones equilibradas en aire. Sin embargo, el O_2 tiene gran capacidad para desactivar los estados excitados tripletes [Lakowicz, 2006]. Ya ha sido reportado que los estados excitados tripletes de las pterinas son desactivados eficientemente por O_2 , pero no los estados excitados singletes [Petroselli, 2009]. Por lo tanto, se puede pensar que $^3\text{Ptr}^*$ está directamente involucrado en el proceso fotosensibilizado.

8.3.2. Irradiación en presencia de yoduro de potasio

Como se detalló en el [Apartado 5.3.2](#), el KI es un eficiente desactivador de los estados excitados singletes y tripletes de Ptr. Sin embargo, dada la diferencia en el tiempo de vida de cada estado, se puede utilizar una concentración de KI en la cual se desactive $^3\text{Ptr}^*$ de forma selectiva [Denofrio, 2014]. Se realizaron experimentos comparativos irradiando disoluciones equilibradas con aire de Ptr y dT en ausencia y en presencia de KI (400 μM). La [Figura 49](#) muestra una clara inhibición del consumo del nucleósido en presencia de KI, indicando que la reacción fotosensibilizada se inicia desde el estado excitado triplete del fotosensibilizador.

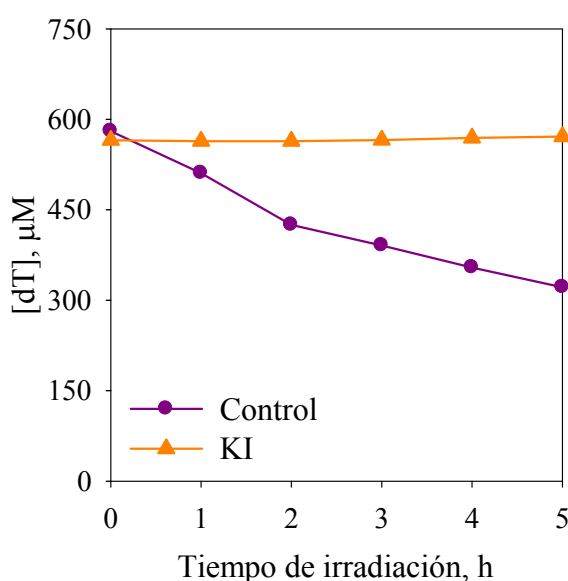
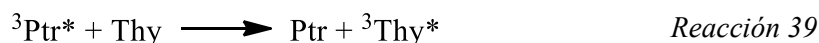


Figura 49. Evolución de la concentración de dT en función del tiempo de irradiación de disoluciones equilibradas con aire de Ptr y dT en ausencia (línea morada) y en presencia (línea naranja) de KI. $[\text{Ptr}]_0 = 150 \mu\text{M}$, $[\text{dT}]_0 = 1 \text{ mM}$, $[\text{KI}] = 400 \mu\text{M}$, $\text{pH} = 5.5 \pm 0.1$.

8.3.3. Factibilidad termodinámica del proceso fotoinducido de transferencia electrónica

Como se mencionaba al inicio del capítulo, Thy genera CPD y 6,4-fotoproductos por absorción directa de radiación UV-B [Banyasz, 2011; Cadet, 1992; Cadet, 2015]. La radiación UV-A también puede dar lugar a la formación de estos productos, pero a través de un mecanismo diferente [Cadet, 2005]. Consiste en la absorción de radiación por un sensibilizador que pueda formar estados excitados capaces de transferir energía a la base, generando así el correspondiente estado excitado triplete de la misma ([Reacción 39](#)). Este triplete

reacciona con una segunda molécula de Thy en estado fundamental, generando los dímeros de Thy (CPD o Thy<>Thy) (Reacción 40).



El valor de $\Delta E_{0,0}^T$ para Thy necesario para que tenga lugar la reacción de dimerización varía entre 267 y 315 KJ mol⁻¹ en función de si se encuentra libre o formando parte de la cadena de ADN [Wood, 1996; Bosca, 2006; Lhiaubet-Vallet, 2007; Cuquerella, 2012]. Por otro lado, el valor de $\Delta E_{0,0}^T$ para Ptr oscila entre 243 y 270 KJ mol⁻¹ [Chahidi, 1981; Song, 2007; Estébanez, 2018]. Al ser menor que el de Thy, el proceso de transferencia de energía triplete-triplete (TTET) es endotérmico y por lo tanto, las Reacciones 39 y 40 pueden ser anuladas.

Si se descarta un mecanismo de transferencia de energía triplete-triplete y se considera que la reactividad de Thy con ¹O₂ es despreciable, el proceso fotosensibilizado de Thy inducido por Ptr en presencia de O₂ debería iniciarse por una transferencia electrónica. Además, los resultados presentados hasta el momento indican que el estado excitado del fotosensibilizador que participa en el proceso es el triplete (Reacción 41).



El valor de $\Delta_{ET}G^0$ reportado en literatura para este proceso es de -100.4 KJ mol⁻¹ [Serrano, 2016], por lo que es termodinámicamente favorable.

8.3.4. Irradiación en presencia de superóxido dismutasa

En un proceso Tipo I, el oxígeno en estado fundamental reacciona de manera eficiente con el radical anión de las moléculas orgánicas para formar O₂^{•-} [Hodgson, 1973; Eriksen, 1977]. Para evaluar la participación de esta especie reactiva de oxígeno en el proceso fotosensibilizado de dT inducido por Ptr, se irradiaron mezclas equilibradas en aire del sensibilizador y el sustrato en ausencia y en presencia de SOD (50 U/mL). Esta enzima cataliza la dismutación de O₂^{•-} en H₂O₂ y O₂ (Apartado 5.3.3), eliminándolo del medio de reacción. La Figura 50 muestra los perfiles de concentración obtenidos con el HPLC. No se observó una aceleración del consumo del sustrato en presencia de SOD, como ocurre por ejemplo con los nucleótidos púricos [Petroselli, 2008; Serrano, 2014]. Este resultado no descarta completamente la participación de O₂^{•-} en la reacción fotosensibilizada, pero se puede afirmar que no existe una vía de recuperación del nucleósido que involucre a esta especie reactiva de oxígeno.

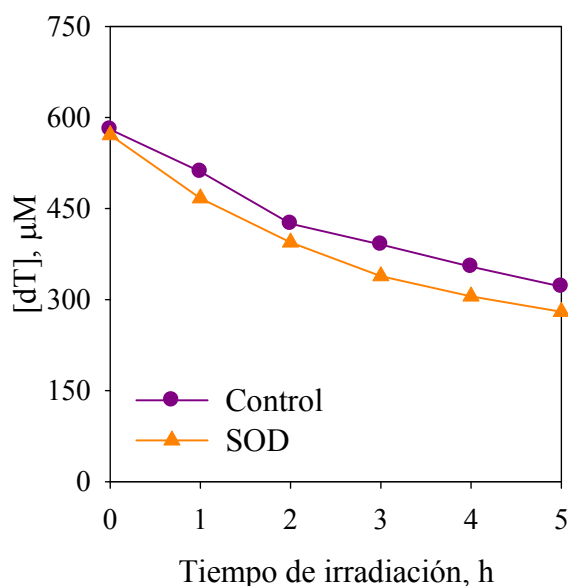


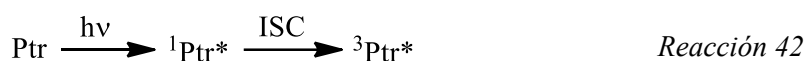
Figura 50. Evolución de la concentración de dT en función del tiempo de irradiación de disoluciones equilibradas con aire de Ptr y dT en ausencia (línea morada) y en presencia (línea naranja) de SOD. $[Ptr]_0 = 150 \mu M$, $[dT]_0 = 1 mM$, $[SOD] = 50 U/mL$, $pH = 5.5 \pm 0.1$.

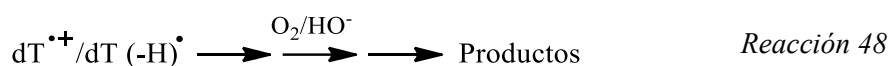
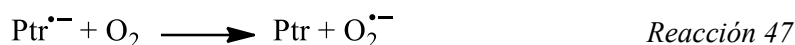
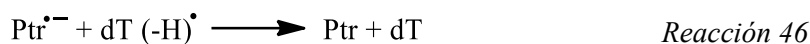
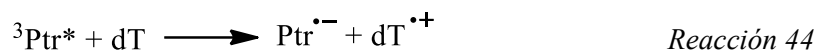
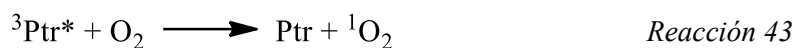
8.3.5. Mecanismo de reacción propuesto

Cuando Ptr absorbe un fotón, pasa del estado fundamental al estado excitado singlete ($^1Ptr^*$), que tras el ISC genera el estado excitado triplete del fotosensibilizador ($^3Ptr^*$) (Reacción 42). $^3Ptr^*$ puede volver al estado fundamental tras sufrir un cruce de sistemas o después de transferir la energía al O_2 para generar 1O_2 (Reacción 43). También puede tener lugar una transferencia electrónica desde dT a $^3Ptr^*$, generando los radicales anión $Ptr^{\cdot-}$ y catión $dT^{+\cdot}$ (Reacción 44). Este último se encuentra en equilibrio con su forma desprotonada ($dT(-H)^{\cdot}$) (Reacción 45), mientras que el radical anión puede estar protonado ($PtrH^{\cdot}$). Aunque Ptr produce 1O_2 bajo irradiación UV-A, hemos visto que sólo la transferencia electrónica genera daño en dT. Además la reacción entre los radicales de Ptr y dT compite con el *back electron transfer* para recuperar a los reactivos de partida (Reacción 46).

En condiciones aeróbicas $Ptr^{\cdot-}/PtrH^{\cdot}$ transfiere un electrón al O_2 , regenerando Ptr y produciendo $O_2^{\cdot-}/HO_2^{\cdot}$ (Reacción 47), que a su vez se desproporciona en H_2O_2 . Esta reacción entre el O_2 y el radical anión previene el *back electron transfer* a dT, llevando a la oxidación de la base sin consumo del sensibilizador. Finalmente, $dT^{+\cdot}/dT(-H)^{\cdot}$ reacciona con O_2 u OH^- , dando lugar a diferentes productos de oxidación.

Durante el desarrollo de este capítulo se ha demostrado que Ptr fotosensibiliza a dT en medio ácido y en presencia de O_2 a través de un mecanismo Tipo I.





8.4. INVESTIGACIÓN DE LOS PRODUCTOS POR UPLC-MS

Los productos generados en la reacción fotosensibilizada de dT inducida por Ptr se estudiaron con la técnica UPLC acoplada a un detector de espectrometría de masas (Aparado 6.3, Equipo 1). Se analizaron los cromatogramas y los espectros de masas obtenidos de disoluciones equilibradas en aire de Ptr y dT a pH 5.5 antes y después de la irradiación.

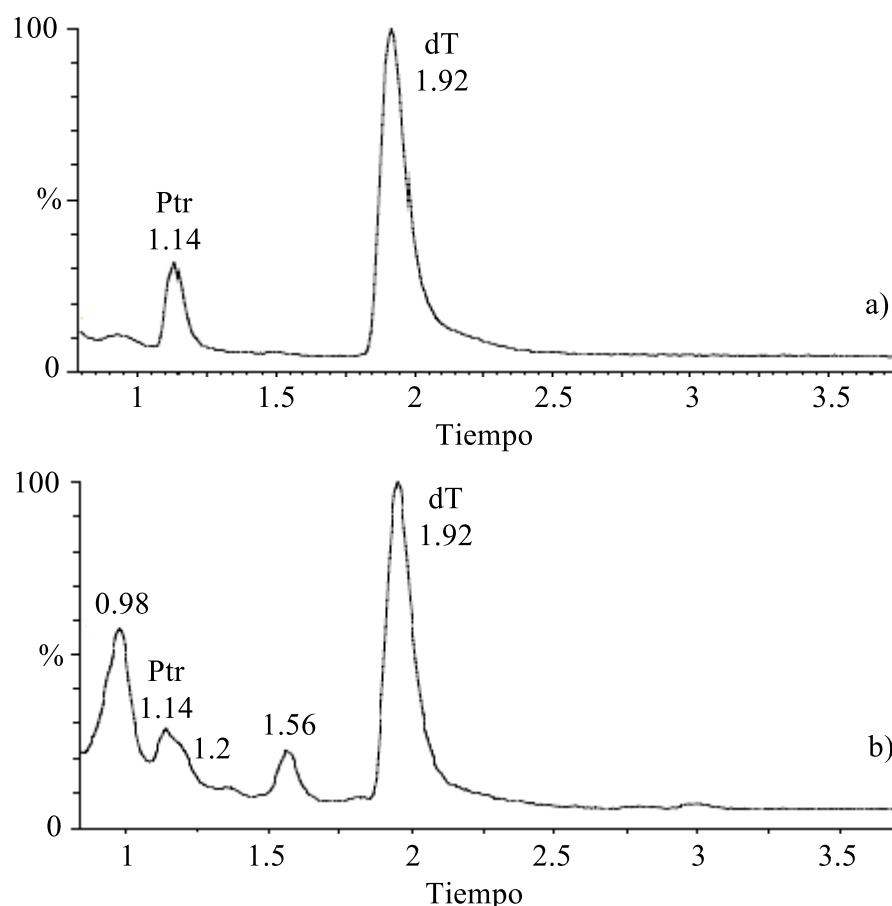


Figura 51. Cromatogramas registrados con el detector de masas de una disolución equilibrada en aire de Ptr y dT antes (a) y después de 3 h (b) de irradiación. $[\text{Ptr}]_0 = 150 \mu\text{M}$, $[\text{dT}]_0 = 1 \text{ mM}$, $\text{pH} = 5.5 \pm 0.1$. Equipo 1.

La [Figura 51.a](#) muestra el cromatograma registrado con el detector de masas de la disolución sin irradiar. En él aparecen dos picos con tiempos de retención de 1.1 y 1.9 minutos correspondientes a Ptr (P.M. = 163.1 g/mol) y dT (P.M. = 242.2 g/mol) respectivamente. Es importante señalar que los tiempos de retención obtenidos en el UPLC no coinciden con los adquiridos con HPLC. Esto es lógico debido a que se está trabajando con diferentes condiciones experimentales, es decir, se ha modificado el equipo, la columna y el flujo. Los espectros de masas en modo negativo (ESI⁻) de los reactivos están representados en la [Figura 52](#), donde pueden observarse los iones moleculares a m/z 162.0415 para [Ptr-H]⁻ y 241.0831 para [dT-H]⁻.

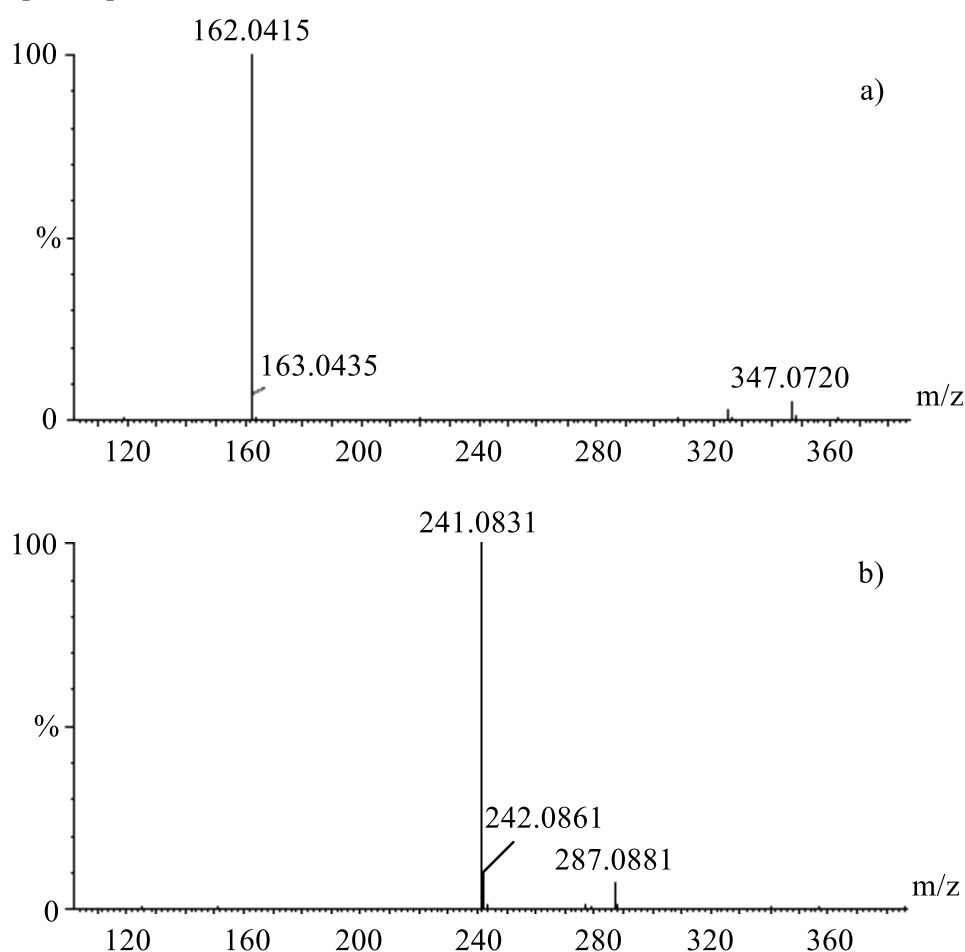


Figura 52. Espectros de masas ESI⁻ de los picos a $t_R = 1.1$ min (a) y a $t_R = 1.9$ min (b) correspondientes a Ptr y dT respectivamente, obtenidos del cromatograma de la mezcla sin irradiar. $[Ptr]_0 = 150 \mu\text{M}$; $[dT]_0 = 1 \text{ mM}$; $\text{pH} = 5.5 \pm 0.1$. Equipo 1.

En la [Figura 51.b](#) aparece el cromatograma de la disolución irradiada durante 3 horas, donde se pueden observar nuevos picos a tiempos de retención menores que el de dT. En los espectros de masas de este cromatograma se encontraron tres productos con pesos moleculares diferentes, todos ellos superiores al del nucleósido. Las masas encontradas fueron [dT+O-3H]⁻ a $t_R = 1.6$ minutos con m/z a 255.0618 ([Figura 53.a](#)), [dT+O-H]⁻ a $t_R = 1.2$ minutos con m/z a 257.0782 ([Figura 53.b](#)) y [dT+2O-H]⁻ a $t_R = 0.9$ minutos con m/z a 275.0886 ([Figura 53.c](#)). Este resultado revela que en la reacción fotosensibilizada de estudio se produce la

oxigenación de dT. La [Tabla 6](#) muestra las relaciones m/z observadas en los espectros de masas y las calculadas, junto con las fórmulas químicas de los compuestos y los errores asociados a las medidas. Para seguir con el análisis de masas, se denominará a los productos en referencia a su peso molecular, es decir, P256, P258 y P275.

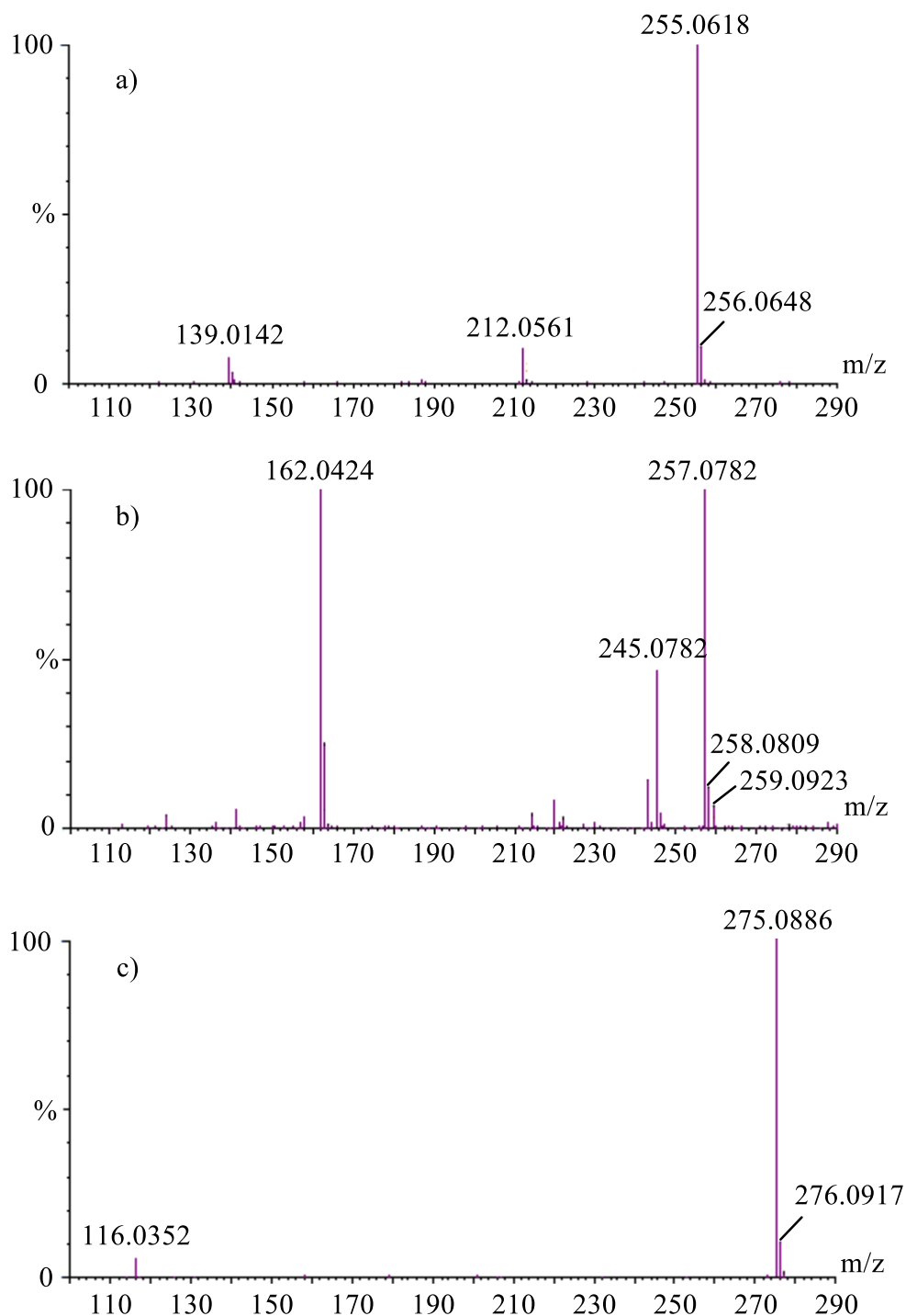


Figura 53. Espectros de masas ESI de los picos a $t_R = 1.6$ min (a), $t_R = 1.2$ min (b) y $t_R = 0.9$ min (c) correspondientes a $[dT+O-3H]^-$, $[dT+O-H]^-$ y $[dT+2O-H]^-$ respectivamente, obtenidos del cromatograma de la mezcla irradiada durante 3 horas. $[Ptr]_0 = 150 \mu M$; $[dT]_0 = 1$ mM; $pH = 5.5 \pm 0.1$. Equipo 1.

Compuesto [M]	Composición elemental [M-H] ⁻	<i>m/z</i> observada	<i>m/z</i> calculada	Error (ppm)
dT	C ₁₀ H ₁₃ N ₂ O ₅	241.0831	241.0829	0.8
[dT+O-2H]	C ₁₀ H ₁₁ N ₂ O ₆	255.0618	255.0618	0
[dT+O]	C ₁₀ H ₁₃ N ₂ O ₆	257.0782	257.0784	0.8
[dT+2O]	C ₁₀ H ₁₅ N ₂ O ₇	275.0886	275.0884	0.7
[M+O-C]	C ₉ H ₁₃ N ₂ O ₆	245.0780	245.0779	0.4
[M+2O-H]	C ₁₀ H ₁₃ N ₂ O ₇	273.0731	273.0728	1.1
[M+3O-2H]	C ₁₀ H ₁₅ N ₂ O ₈	291.0831	291.0834	1.0

Tabla 6. Relaciones *m/z* observadas y calculadas, fórmulas químicas y errores de los productos obtenidos en los espectros de masas de la mezcla de Ptr y dT irradiada durante 3 horas en presencia de O₂. Equipo 1.

La Figura 54 muestra los espectros MS/MS ESI⁻ de los reactivos, donde se observó el patrón de fragmentación característico para cada uno de ellos. Las señales de Ptr observadas son las resultantes de las pérdidas de agua (C₆H₂N₅, *m/z* 144.0294), de -CONH (C₅H₃N₄, *m/z* 119.0355) y de -C₂N₂O (C₄H₄N₃, *m/z* 94.0404) [Hettich, 1995; Van Daele, 2016]. Los fragmentos observados en el caso de dT son la base nitrogenada debido a la pérdida del azúcar por la ruptura del enlace N-glicosídico (C₅H₅N₂O₂, *m/z* 125.0350), el resultante de la pérdida de -CONH (C₉H₁₂N₁O₄, *m/z* 198.0760) y el originado tras perder -C₃H₆O (C₇H₇N₂O₄, *m/z* 151.0507) [McLuckey, 1992; Bald, 2012; Serrano, 2016].

Para realizar la identificación de los productos se hizo un estudio de las fragmentaciones obtenidas en los espectros MS/MS (Figura 55). El espectro MS/MS de P256 (Figura 55.a) muestra el fragmento obtenido tras la ruptura del enlace N-glicosídico, con la consecuente pérdida de la ribosa, con un valor *m/z* a 139.0142 ([M-ribosa-H]⁻). Además aparece el fragmento con *m/z* a 212.0561, obtenido tras la pérdida del grupo CONH ([M-CONH-H]⁻). Al comparar estos resultados con los encontrados en literatura [Serrano, 2016], se puede afirmar que el P256 es el 5-formil-2'-desoxiuridina (5-FordU). El espectro MS/MS ESI⁻ de P258 (Figura 55.b) presenta una fragmentación similar a P256, ya que aparecen los fragmentos a *m/z* 141.0311 ([M-ribosa-H]⁻) y 214.0730 ([M-CONH-H]⁻) correspondientes a las pérdidas de la ribosa y del grupo CONH respectivamente. Después de contrastar estos datos con los proporcionados por la bibliografía

[Serrano, 2016], asignamos este compuesto al 5-(hidroximetil)-2'-desoxiuridina (5-HmdU). Por último, en el espectro MS/MS de P276 (Figura 55.c) se identificaron dos fragmentos m/z a 142.0146 y 158.0469, correspondientes a $[M+2OH-NH_3-H]^-$ y $[M-Thy+NCO-H]^-$ respectivamente. Esta fragmentación es característica del 5,6-dihidroxi-5,6-dihidrotimidina (timidina glicol, dTGly) [Serrano, 2016]. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 7.

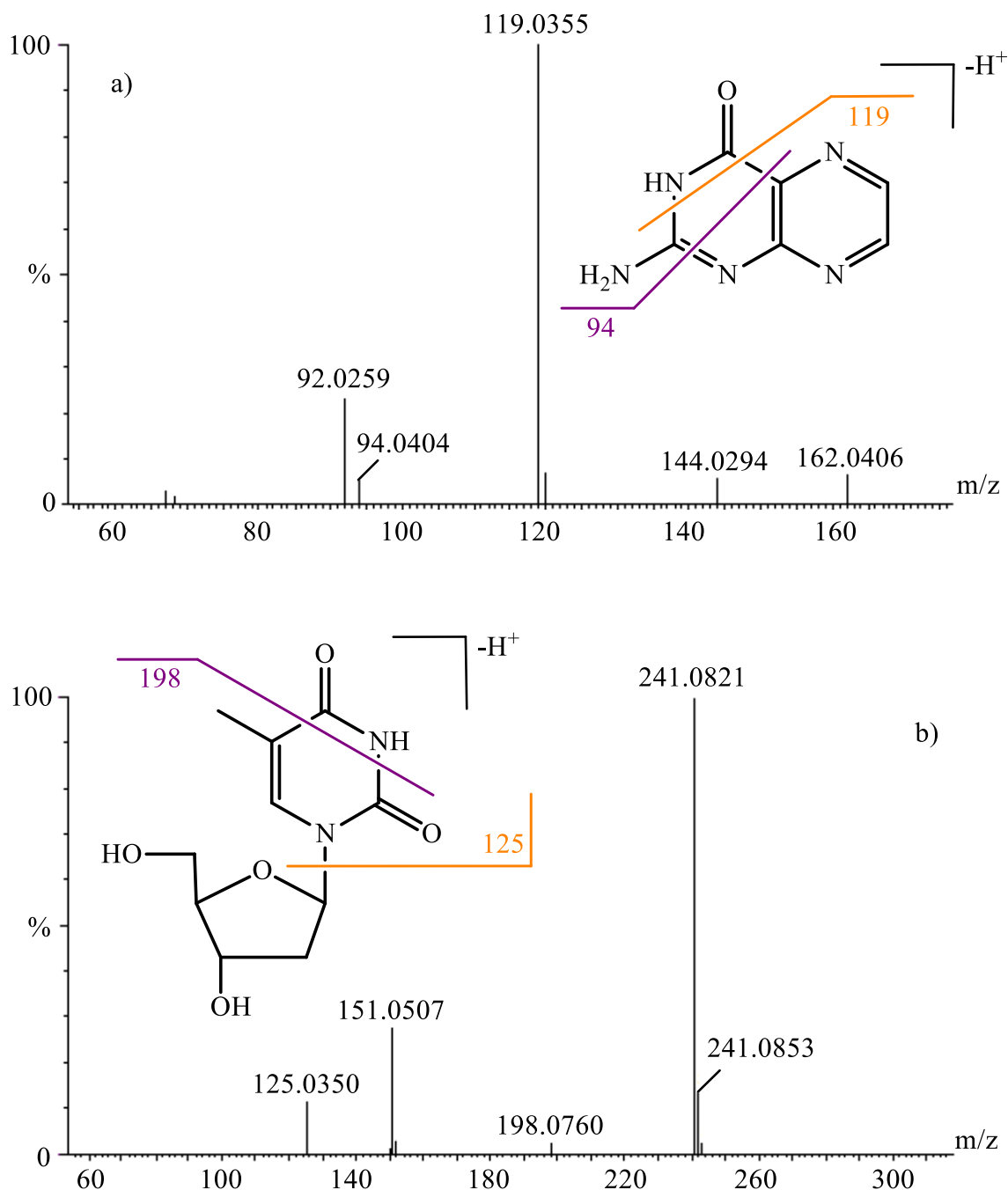


Figura 54. Espectros MS/MS ESI de Ptr (a) y dT (b). $[Ptr]_0 = 150 \mu M$; $[dT]_0 = 1 mM$; $pH = 5.5 \pm 0.1$. Equipo 1.

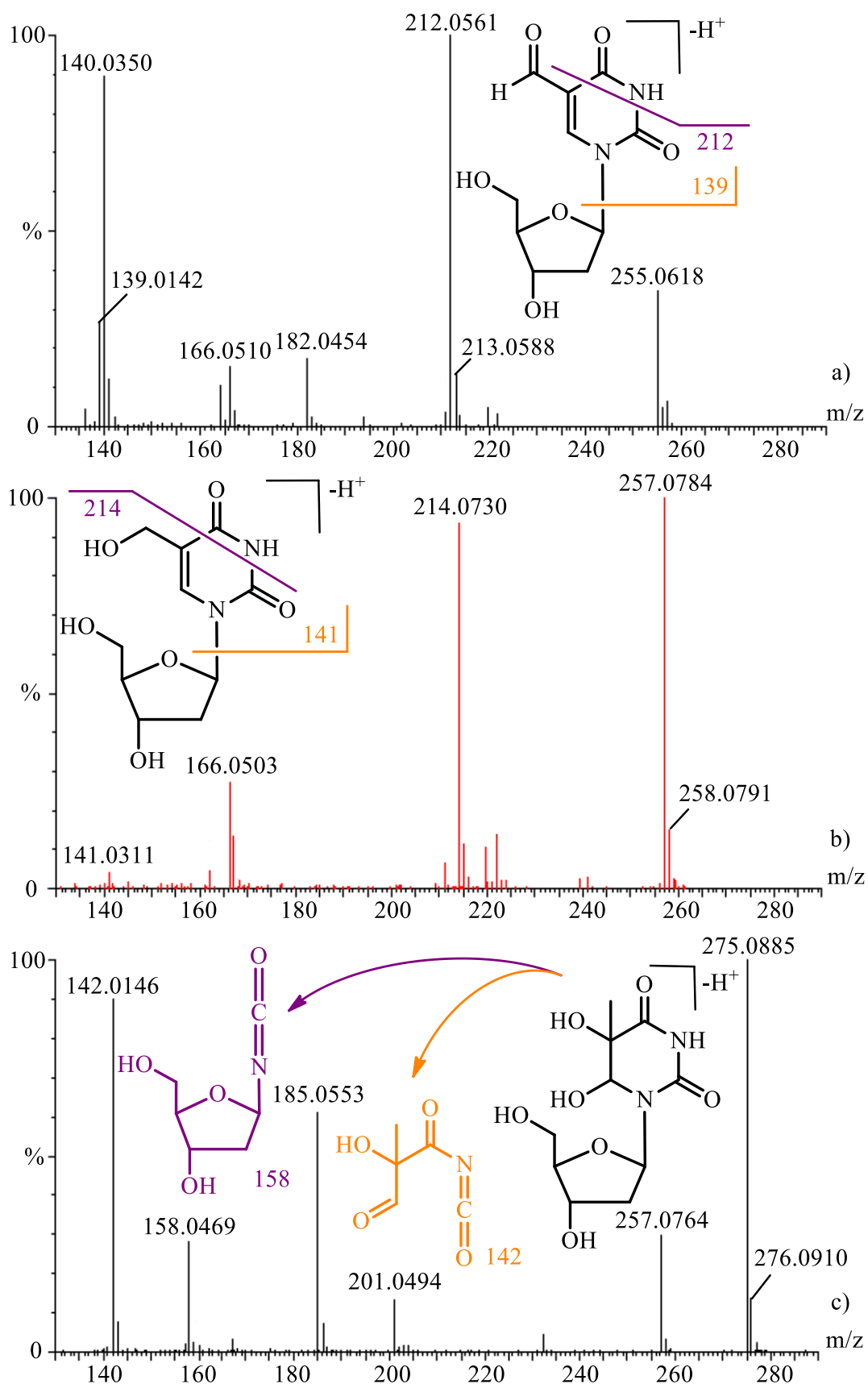


Figura 55. Espectros MS/MS ESI de los picos correspondientes a P256 (a), P257 (b) y P275 (c). $[Ptr]_0 = 150 \mu M$; $[dT]_0 = 1 mM$; $pH = 5.5 \pm 0.1$. Equipo 1.

Fragmento	Composición elemental [M-H] ⁻	<i>m/z</i> observada	<i>m/z</i> calculada	Error (ppm)
[dT+O-3H]⁻ <i>t_R</i> = 1.6 min	C ₁₀ H ₁₁ N ₂ O ₆	255.0618	255.0623	1.9
[M-ribosa-H] ⁻	C ₅ H ₃ N ₂ O ₃	139.0142	139.0149	5.0
[M-CONH-H] ⁻	C ₉ H ₁₀ NO ₅	212.0561	212.0565	1.9
[dT+O-H]⁻ <i>t_R</i> = 1.2 min	C ₁₀ H ₁₃ N ₂ O ₆	257.0784	257.0779	1.9
[M-ribosa-H] ⁻	C ₅ H ₅ N ₂ O ₃	141.0311	141.0306	3.5
[M-CONH-H] ⁻	C ₉ H ₁₂ NO ₅	214.0730	214.0721	4.2
[dT+2O-H]⁻ <i>t_R</i> = 0.9 min	C ₁₀ H ₁₅ N ₂ O ₇	275.0884	275.0885	0.4
[M+2OH-NH ₃ -H] ⁻	C ₅ H ₄ NO ₄	142.0146	142.0146	0
[M-Thy+NCO-H] ⁻	C ₆ H ₈ NO ₄	158.0469	158.0459	6.3

Tabla 7. Relaciones *m/z* observadas y calculadas, fórmulas químicas y errores de los principales fragmentos obtenidos en los espectros MS/MS de los productos. Equipo 1.

Finalmente, en los espectros de masas se detectaron otros tres productos con señales *m/z* a 245.0780, 273.0731 y 291.0831, que se pueden atribuir a especies [M+O-C-H]⁻, [M+2O-2H]⁻ y [M+3O-3H]⁻ respectivamente (Tabla 6). Todos ellos presentaban señales muy débiles y no fue posible registrar los espectros MS/MS. Sin embargo, con la información reportada en literatura se pueden asignar a 5-hidroxi-5-metilhidantoína (5-OH-5-MH), 5-hidroperoximetil-2'-desoxiuridina (5-HPmdU) y 5-hidroperoxi-6-hidroxi-5,6-dihidrotimidina (5-HP-6OHdT) respectivamente [Wagner, 1994; Serrano, 2016].

9. FOTOSENSIBILIZACIÓN DE TIMIDINA INDUCIDA POR PTERINA EN AUSENCIA DE OXÍGENO. GENERACIÓN FOTOQUÍMICA DE ADUCTOS FLUORESCENTES

En el [Capítulo 8](#) se estudió la degradación de dT fotoinducida por Ptr en presencia de O₂, se analizaron los fotoproductos y se propuso un mecanismo de reacción de fotooxidación Tipo I. Además se mencionó que la reacción fotosensibilizada también ocurre en condiciones anaeróbicas. Esto ya se había observado en estudios previos del grupo de investigación para dTMP, en los cuales se descubrió la formación de un aducto entre Ptr y el nucleótido (Ptr-dTMP). Este producto presenta propiedades espectroscópicas similares a las de Ptr, evidenciando que el fotosensibilizador mantiene su estructura intacta. Los estudios de espectrometría de masas en modo negativo (ESI⁻) mostraron una señal *m/z* a 482.0823, revelando que el peso molecular de este producto coincide con la suma de las masas de Ptr (P.M. = 163.1 g/mol) y dTMP (P.M. = 322.2 g/mol) menos dos átomos de hidrógeno que se pierden en la formación del enlace covalente (Ptr+dTMP-2H) [Serrano, 2016].

En el presente capítulo se estudiarán los procesos fotosensibilizados por Ptr sobre diferentes nucleótidos y nucleósidos, con el objetivo de buscar aductos fluorescentes formados entre Ptr y los componentes del ADN. Asimismo, se evaluará la eficiencia del proceso de formación de aductos con los diferentes sustratos, y se planteará el mecanismo de reacción para cada uno de ellos.

9.1. FOTOSENSIBILIZACIÓN DE NUCLEÓTIDOS POR PTERINA EN AUSENCIA DE O₂

Como se mencionó en el [Apartado 4.3.4.2](#), cuando se expone a radiación UV-A una mezcla de Ptr y dTMP a pH 5.5 y en ausencia de O₂, el resultado es la unión covalente de ambas moléculas con la consecuente pérdida de dos hidrógenos. La formación de este producto conlleva un consumo de fotosensibilizador y sustrato en una relación 1:1, es decir, que por cada molécula de sustrato se consume una de fotosensibilizador. Este es un aspecto relevante, ya que previamente no se había observado reacción entre Ptr y los componentes del ADN en ausencia de O₂. El objetivo de este apartado es comprobar si este producto se genera sólo con el nucleótido de Thy, o si se forman aductos fluorescentes similares con las otras bases del ADN.

El estudio se llevó a cabo con dGMP, dAMP, dCMP y dTMP. Se prepararon mezclas acuosas de Ptr con el nucleótido correspondiente y se llevaron a pH 5.5 para asegurar que el 99 % del fotosensibilizador se encuentra en la forma ácida. A continuación se burbujearon con Ar durante 20 minutos para eliminar el O₂

disuelto y se irradiaron con lámparas Rayonet a 350 nm (**Sistema de irradiación I**) durante diferentes tiempos. Al excitar a 350 nm, la única especie que absorbe radiación es Ptr, ya que las bases del ADN no presentan absorbancia en esta región (**Apartado 2.1.1**). Por último, las disoluciones se analizaron mediante HPLC para cuantificar la concentración de los sustratos y del fotosensibilizador a cada tiempo de irradiación y, si hubiera reacción, detectar los productos de las reacciones fotosensibilizadas. A modo de control, se irradió una disolución de Ptr en ausencia de sustrato y en las mismas condiciones experimentales para conocer el consumo del fotosensibilizador debido a su propia fotoquímica.

La **Figura 56** muestra las cinéticas de consumo de Ptr y de los nucleótidos. Sólo se observó un consumo importante de Ptr, aproximadamente un 60 %, al utilizar dTMP como sustrato. Con ninguno de los otros tres nucleótidos se observó una disminución de la concentración de Ptr mayor que la observada en el control (**Figura 56**, línea punteada). Estos resultados ponen en evidencia que la formación del aducto con dGMP, dAMP y dCMP no ocurre o tiene un rendimiento cuántico muy bajo.

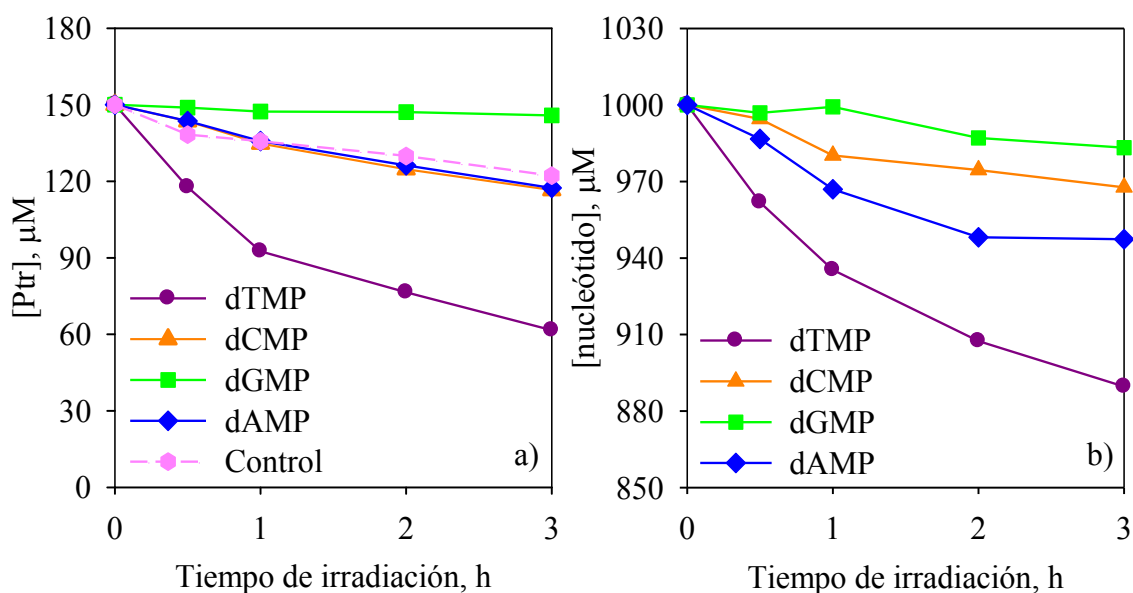


Figura 56. Evaluación temporal de la concentración de Ptr (a) y de los nucleótidos (b) a distintos tiempos de irradiación de soluciones acuosas en condiciones anaeróbicas. La línea punteada refleja el consumo de Ptr tras su irradiación en ausencia de nucleótido. $[Ptr]_0 = 150 \mu M$; $[nucleótido]_0 = 1000 \mu M$; $pH = 5.5 \pm 0.1$.

En los cromatogramas de las disoluciones de dGMP irradiadas en presencia de Ptr no se observaron productos, mientras que para el caso de dAMP, dTMP y dCMP aparecen varios picos cromatográficos que crecen con el tiempo de irradiación. Algunos de los productos generados con dTMP y dCMP presentan absorbancia a 340 nm y emisión de fluorescencia ($\lambda_{ex} = 340 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 450 \text{ nm}$) en las condiciones de emisión de Ptr (**Figura 57**), mientras que los obtenidos con dAMP no absorben a 340 nm. Las **Figuras 58** y **59** muestran los espectros de

absorbancia de diferentes fotoproductos encontrados tras la irradiación en condiciones anaeróbicas de dTMP y dCMP en presencia de Ptr, respectivamente. Todos ellos son similares al espectro de absorbancia del sensibilizador. Estos resultados sugieren que para ambos sustratos se forman varios aductos entre Ptr y el nucleótido. Sin embargo, el rendimiento de formación del aducto con dCMP es significativamente más bajo que el de su análogo de Thy, y por lo tanto, no se observa un consumo apreciable de sustrato y fotosensibilizador.

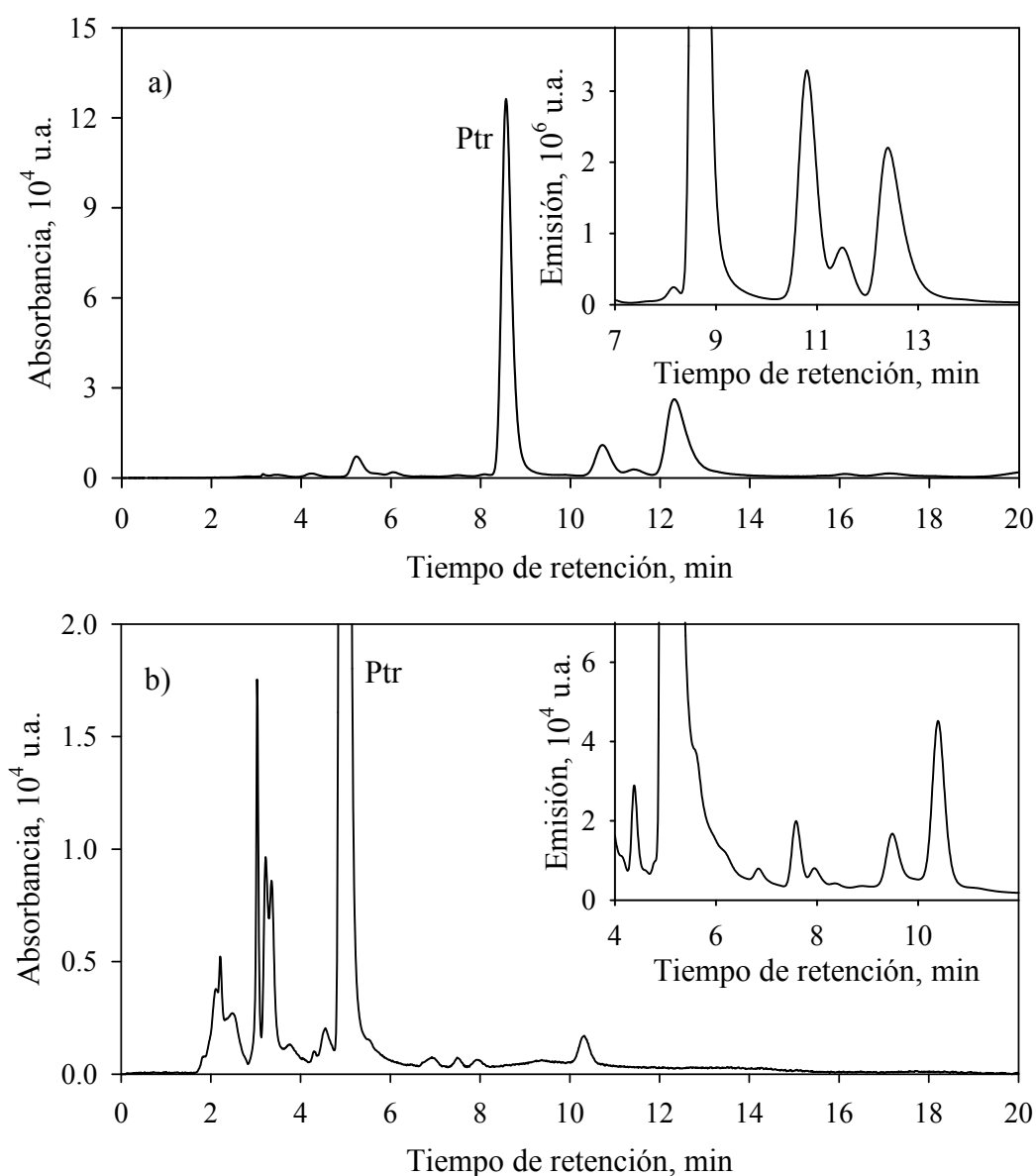


Figura 57. Cromatogramas a 340 nm de las mezclas Ptr–dTMP (a) y Ptr–dCMP (b) a las 3 h de irradiación de disoluciones acuosas en condiciones anaeróbicas. Inset: cromatograma de fluorescencia ($\lambda_{ex} = 340$ nm; $\lambda_{em} = 450$ nm). $[Ptr]_0 = 150$ μ M; $[nucleótido]_0 = 1$ mM; $pH = 5.5 \pm 0.1$.

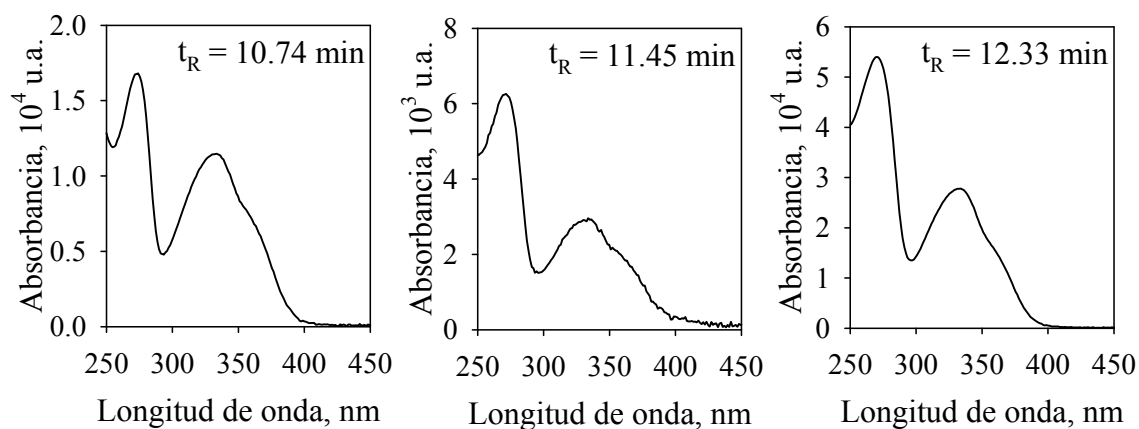


Figura 58. Espectros de absorbancia extraídos del HPLC de algunos de los fotoproductos obtenidos tras la irradiación de Ptr y dTMP en condiciones anaeróbicas. $[Ptr]_0 = 150 \mu\text{M}$; $[dTMP]_0 = 1 \text{ mM}$; $\text{pH} = 5.5 \pm 0.1$.

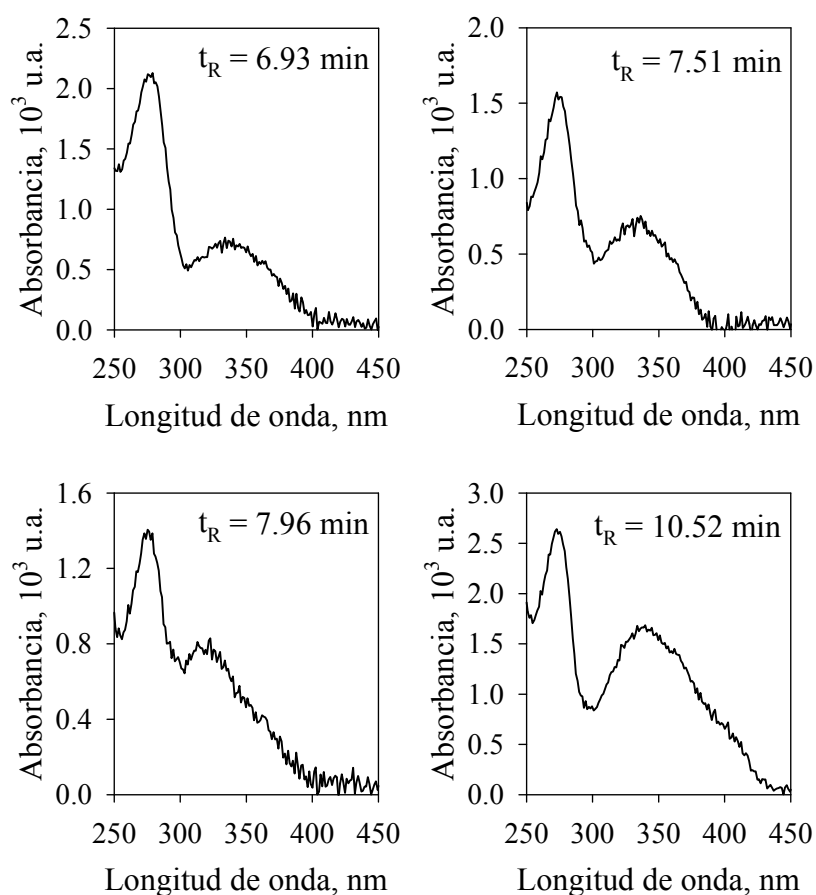


Figura 59. Espectros de absorbancia extraídos del HPLC de algunos de los fotoproductos obtenidos tras la irradiación de Ptr y dCMP en condiciones anaeróbicas. $[Ptr]_0 = 150 \mu\text{M}$; $[dCMP]_0 = 1 \text{ mM}$; $\text{pH} = 5.5 \pm 0.1$.

En este proceso, dTMP y Ptr se consumen manteniendo una estequiometría 1:1 en los primeros tiempos de irradiación, dentro del error experimental. Este aspecto se observa claramente al representar el consumo en moles de los reactivos (Figura 60), apreciando que por cada molécula de Ptr se consume una molécula de nucleótido.

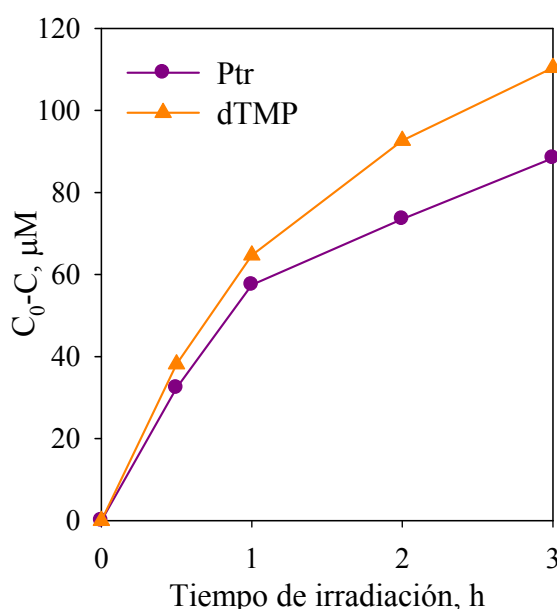


Figura 60. Consumo en moles de dTMP (línea naranja) y Ptr (línea morada) a distintos tiempos de irradiación de disoluciones acuosas en condiciones anaeróbicas. $[Ptr]_0 = 150 \mu\text{M}$; $[dTMP]_0 = 1 \text{ mM}$; $\text{pH} = 5.5 \pm 0.1$.

En esta sección se han presentado resultados que apuntan a la formación de aductos entre Ptr y las dos bases pirimidínicas del ADN. Para confirmarlo, se realizó un estudio de espectrometría de masas en el Capítulo 10. El espectro de absorbancia de estos productos presenta la banda de menor energía característica de Ptr, centrada en torno a los 340 nm, y además emiten a 450 nm cuando se les excita a 340 nm. Sus propiedades espectroscópicas, especialmente su fluorescencia, les convierten en productos interesantes ya que se puede pensar en su aplicación como sondas fluorescentes de ADN.

9.2. FORMACIÓN DE ADUCTOS FLUORESCENTES ENTRE PTERINA Y TIMIDINA

En el apartado anterior se estudió la generación de aductos fluorescentes entre Ptr y los nucleótidos pirimidínicos. A continuación, se pretende probar si el fosfato juega algún papel importante en esta reacción. Para ello, se llevó a cabo la reacción en las mismas condiciones experimentales, pero utilizando como sustrato

dT. En este caso no se trabajó con dC porque presenta una cinética mucho más lenta y la formación del producto es prácticamente despreciable si se compara con su análogo de Thy.

Se siguió el mismo procedimiento que en el apartado anterior, es decir, se prepararon mezclas acuosas a pH 5.5 de Ptr y dT. Las concentraciones de los reactivos variaron entre 100 – 200 μM para Ptr y entre 0.5 – 1 mM para dT. Las mezclas se burbujearon durante 20 minutos con Ar para eliminar el O_2 disuelto en el medio y se irradiaron durante diferentes tiempos a 350 nm (**Sistema de irradiación I**).

Se observó una disminución tanto en la concentración de sustrato como en la de fotosensibilizador, con una relación estequiométrica de 1:1 (**Figura 61**). Al igual que ocurría con dTMP, en los cromatogramas de las muestras irradiadas aparecen varios picos cromatográficos nuevos con espectros de absorción similares al de Ptr y que emiten a 450 nm cuando se excitan a 340 nm. Dentro de estos productos, el que presenta mayor área en el cromatograma registrado a 340 nm es un pico a mayor tiempo de retención ($t_R = 11.1$ minutos) que el de Ptr ($t_R = 4.6$ minutos) y dT ($t_R = 5.9$ minutos) (**Figura 62**).

La **Figura 63** representa la evolución temporal del fotoproducto con mayor área en el cromatograma a 340 nm ($t_R = 11.1$ minutos), mostrando un rápido incremento de la concentración con el tiempo de irradiación durante las tres primeras horas.

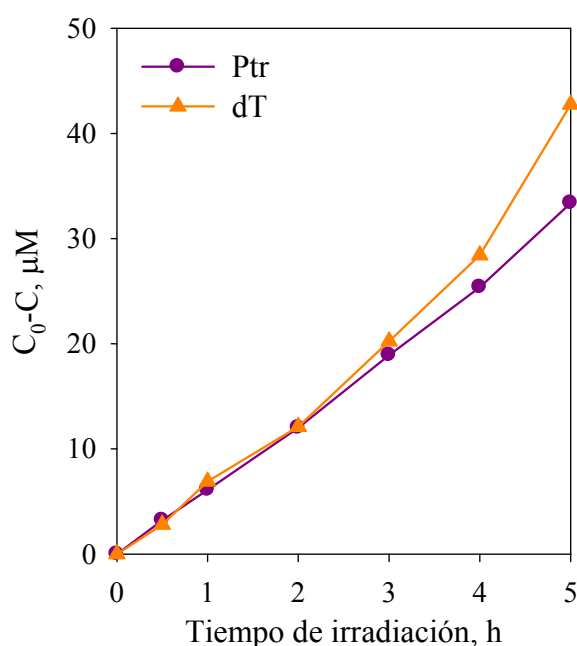


Figura 61. Evolución temporal del consumo de Ptr (línea morada) y dT (línea naranja) bajo irradiación UV-A en ausencia de O_2 . $[\text{Ptr}]_0 \approx 100 \mu\text{M}$; $[\text{dT}]_0 \approx 500 \mu\text{M}$; $\text{pH} = 5.5 \pm 0.1$.

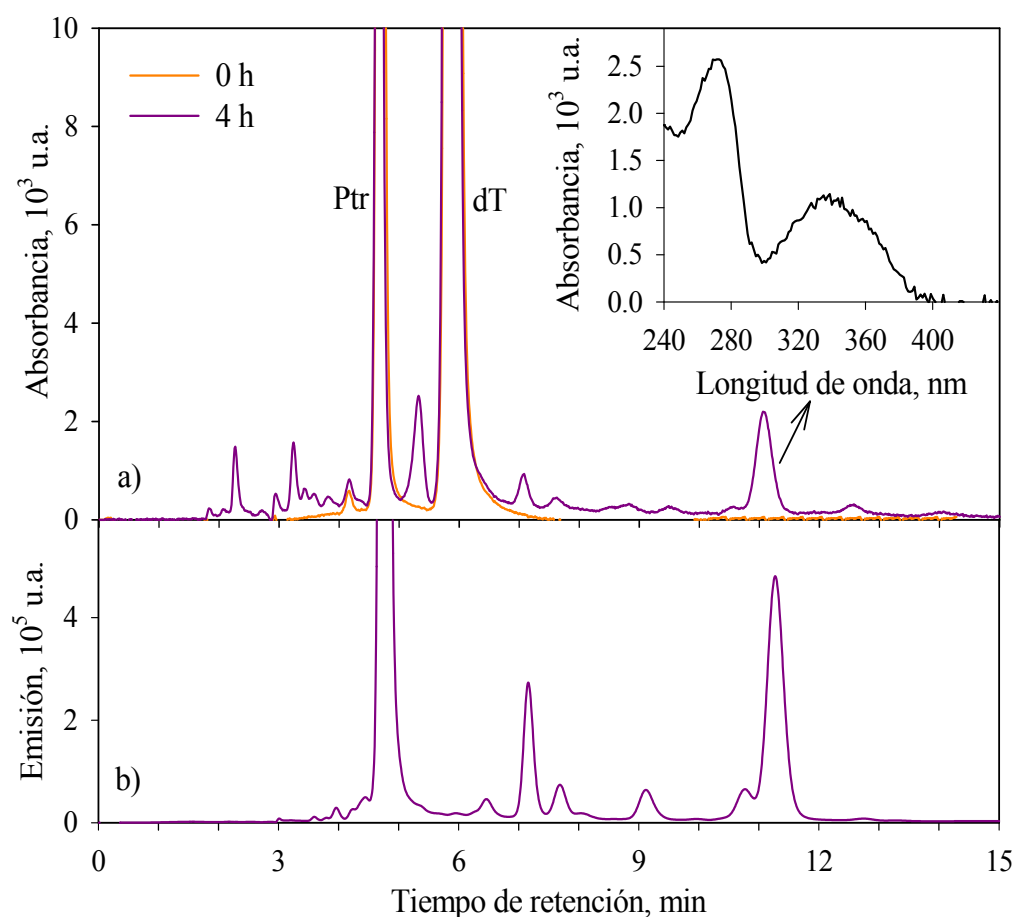


Figura 62. a) Cromatograma a 280 nm de una mezcla de Ptr y dT antes (línea naranja) y después de 4 horas de irradiación (línea morada) en ausencia de O_2 . Inset: espectro de absorbancia del fotoproducto a $t_R = 11.1$ min; b) Cromatograma obtenido con el detector de fluorescencia de la muestra irradiada 4 horas ($\lambda_{ex} = 340$ nm; $\lambda_{em} = 450$ nm). $[Ptr]_0 \approx 100 \mu M$; $[dT]_0 \approx 500 \mu M$; $pH = 5.5 \pm 0.1$.

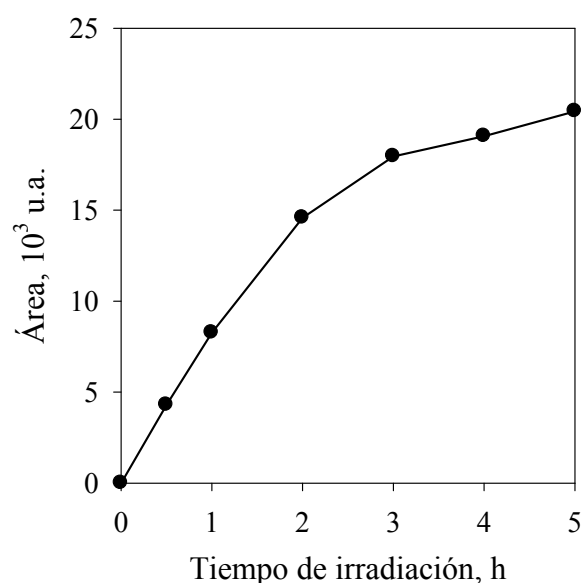


Figura 63. Evolución temporal del área del pico del producto a $t_R = 11.2$ min, integrado en el cromatograma a 340 nm. $[Ptr]_0 \approx 100 \mu M$; $[dT]_0 \approx 500 \mu M$; $pH = 5.5 \pm 0.1$.

Algunos de los otros productos que se observan en el cromatograma, también pueden ser aductos entre Ptr y dT con diferentes estructuras químicas, ya que presentan espectros de absorción similares a Ptr y emisión de fluorescencia de las mismas características que la del fotosensibilizador. Sin embargo, en este apartado no les vamos a considerar ya que son productos minoritarios.

Como se detalló anteriormente ([Apartado 3.2](#)), Ptr posee un pK_a de 7.9, presentando dos formas ácido-base con diferente reactividad. Por ello se repitieron los estudios a pH alcalino ($pH \approx 10.5$) para evaluar la formación del aducto con la forma alcalina de Ptr. Al analizar los cromatogramas a 340 nm de muestras irradiadas durante 2 horas, se observó un pico con las características del aducto ([Figura 64](#)). Sin embargo, si se compara el área del producto con el obtenido al irradiar una disolución a pH 5.5 en las mismas condiciones experimentales, podemos observar que el área del producto con tiempo de retención de 11.1 minutos generado en medio alcalino es mucho menor que el obtenido en medio ácido (≈ 12500 u.a. y ≈ 269000 u.a., respectivamente). Concretamente, el aducto generado a pH 10.5 es solamente el 4.6 % con respecto al formado a pH 5.5. Esto se puede deber a la contribución de la forma ácida de Ptr en la mezcla, ya que no debemos olvidar que aunque estemos trabajando a pH 10.5, siempre queda una pequeña porción de Ptr en su forma ácida.

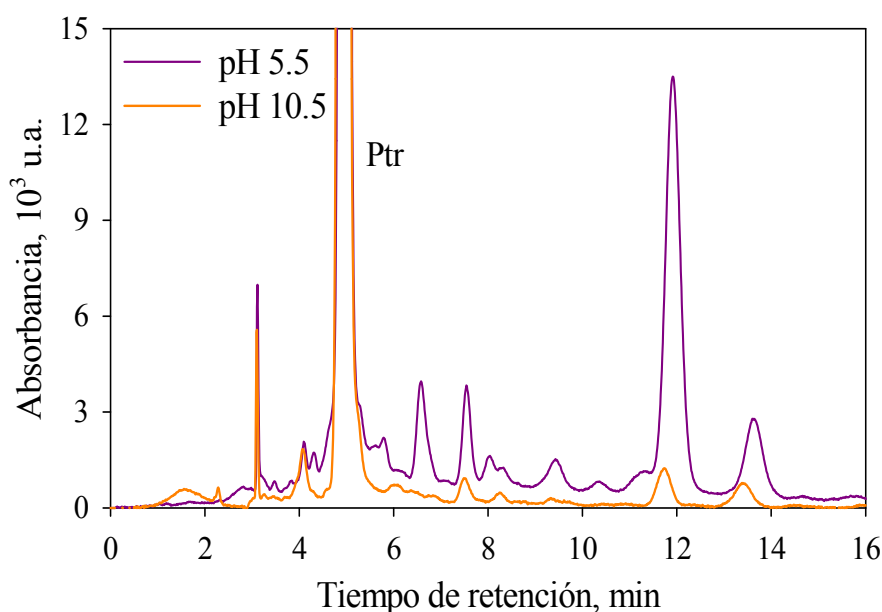
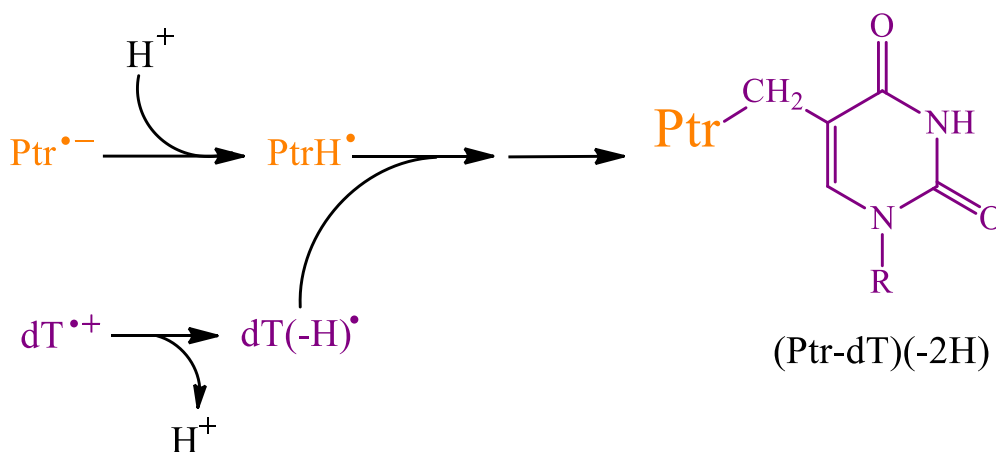
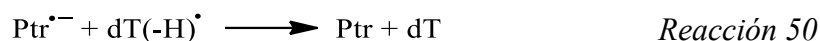
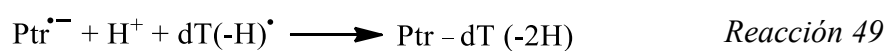


Figura 64. Cromatogramas a 340 nm de una mezcla de Ptr y dT expuesta a radiación UV-A en ausencia de O_2 a pH 5.5 (línea morada) y pH 10.5 (línea naranja). $[Ptr]_0 = 150 \mu M$; $[dT]_0 = 1 mM$.

El comportamiento explicado en los párrafos previos es similar al observado con la irradiación de dTMP en presencia de Ptr bajo condiciones anaeróbicas, donde se genera un aducto entre el sensibilizador y el nucleótido de Thy ($[Ptr+dTMP-3H]^+$, m/z 482.0823) [Serrano, 2016]. Por lo tanto, estos resultados

sugieren que el producto detectado a un tiempo de retención de 11.1 minutos mantiene intacta la estructura de Ptr. Esto permite confirmar que el fosfato no participa en el proceso fotoquímico de la formación del aducto, tal y como se esperaba.

Este producto tiene lugar tras la recombinación de $\text{Ptr}^{\bullet-}$ y $\text{dT}(-\text{H})^{\bullet}$ (Reacción 49, Esquema 9). Esta reacción compite con la transferencia electrónica entre los radicales $\text{dT}(-\text{H})^{\bullet}$ y $\text{Ptr}^{\bullet-}$ (*back electron transfer*), regenerando los compuestos en su estado fundamental (Reacción 50). Como se demostró en el Capítulo 8, la formación del aducto no tiene lugar en presencia de O_2 . Esto se debe a que el $\text{Ptr}^{\bullet-}$ reacciona con el O_2 del medio para regenerar al fotosensibilizador y producir $\text{O}_2^{\bullet-}$. Por lo tanto, el consumo de dT en Ar es mucho menor que en aire (Figura 42.a).



Esquema 9. Mecanismo propuesto para la generación del aducto $\text{Ptr-dT}(-2\text{H})$.

10. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE ADUCTOS FLUORESCENTES GENERADOS ENTRE PTERINA Y NUCLEÓSIDOS

El objetivo de este capítulo es abordar la caracterización estructural de los aductos formados entre Ptr y las bases pirimidínicas. El hecho de trabajar con los aductos generados con los nucleósidos en lugar de con los nucleótidos, aporta mayor sencillez estructural debido a la eliminación del grupo fosfato. La caracterización estructural se realizó con espectrometría de masas. También se realizó una breve comparación con otros fotosensibilizadores pterínicos para terminar de dilucidar la estructura del aducto.

10.1. ANÁLISIS DEL ADUCTO PTERINA–TIMIDINA POR UPLC-MS

Con el fin de investigar la estructura química del aducto generado entre Ptr y dT, se realizó un estudio de masas por ionización *electrospray*. Las muestras se separaron previamente con un equipo de UPLC que está acoplado al espectrómetro de masas (UPLC-MS, [Apartado 6.3](#), Equipo 1). Cada pico obtenido en los cromatogramas se analizó en modo negativo (ESI⁻) y en modo positivo (ESI⁺). En este estudio se compararon los cromatogramas y los espectros de masas obtenidos para las mezclas de Ptr y dT antes y después de la irradiación durante diferentes tiempos en ausencia de O₂. Además, se analizaron los espectros MS/MS de los productos encontrados.

En la disolución sin irradiar se observan tres picos cromatográficos con unos tiempos de retención de 0.29, 0.48 y 0.84 minutos ([Figura 65.a](#)). El primero aparece en todos los cromatogramas (aunque se inyecte agua), y se debe a alguna impureza polimérica proveniente del equipo. Por otra parte, los dos últimos corresponden a los iones moleculares intactos de Ptr y dT, respectivamente. Las masas de estos iones moleculares son 164.0572 y 243.0981 Da en modo positivo ([M+H]⁺) y 162.0415 y 241.0827 Da en modo negativo ([M-H]⁻). La mejor resolución se logró en los cromatogramas obtenidos en modo negativo, por lo que los resultados de este apartado se mostrarán en dicho modo. Debido a que con el UPLC se trabaja con condiciones experimentales diferentes que en el estudio de HPLC (equipo, columna y flujo), los tiempos de retención no coinciden con los mostrados en capítulos anteriores ([Capítulos 8 y 9](#)).

En los cromatogramas de las disoluciones irradiadas aparecen dos picos nuevos con unos tiempos de retención de 1.29 y 1.46 minutos ([Figura 65.b](#)). Sus espectros de masas muestran una señal *m/z* a 402.1155 ([Figura 66](#)), la cual se puede asignar a un compuesto que contenga las estructuras de Ptr y dT ([Ptr+dT–3H]⁻). No se encontraron más picos cromatográficos con esa masa ([Figura 67](#)). Este resultado indica que en la reacción fotosensibilizada de dT en presencia de

Ptr, en condiciones anaeróbicas y medio ácido, se forman al menos dos aductos. El hecho de que los productos no se encuentren en el mismo tiempo de retención es un indicio de que, a pesar de tener idéntico peso molecular, su estructura química es diferente.

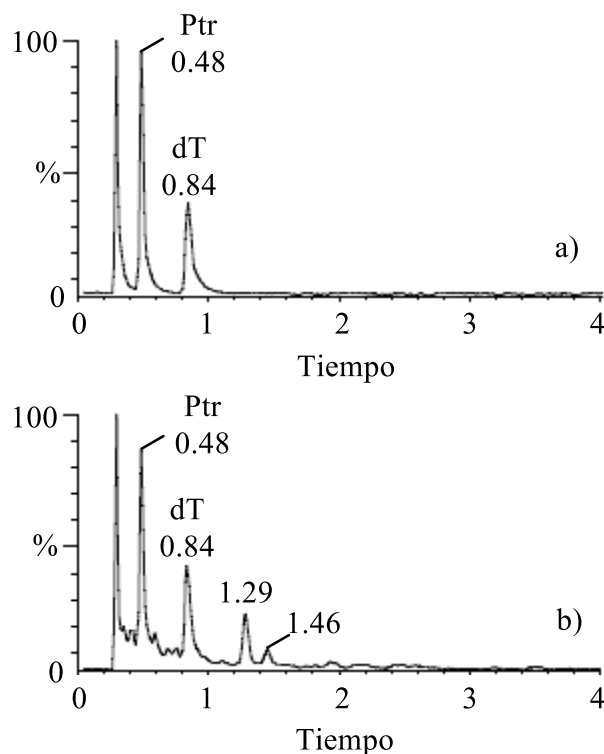


Figura 65. Cromatogramas registrados en el UPLC de mezclas de Ptr y dT. (a) Disolución sin irradiar. (b) Disolución irradiada durante 4 h en condiciones anaeróbicas. $[Ptr]_0 = 150 \mu\text{M}$; $[dT]_0 = 1 \text{ mM}$; $\text{pH} = 5.5 \pm 0.1$. Equipo 1.

Para realizar un estudio más detallado sobre dichas estructuras, se analizaron los espectros MS/MS de estos productos. El error aceptado para la asignación de fragmentos es de 5 ppm, sin embargo, cuando el equipo trabaja con moléculas de bajo peso molecular el error se incrementa. Por ello, en este estudio consideraremos aceptables los fragmentos que presenten una diferencia con respecto a la masa teórica de 10 ppm como máximo. La Figura 68 muestra el espectro MS/MS ESI⁻ del producto que aparece a un tiempo de retención de 1.29 minutos. En él aparece una señal intensa con m/z a 286.0691 correspondiente a la pérdida del azúcar, una ruptura típica del enlace N-glicosídico, dando lugar al fragmento $[\text{Ptr}+\text{Thy}-3\text{H}]^-$. Si consideramos que el aducto se ha formado por la unión de Ptr al grupo metilo de dT [Serrano, 2016], podemos pensar en dos fragmentaciones diferentes. Una de ellas puede ser la ruptura del enlace que se forma con la unión de ambas moléculas, es decir, se obtendrían los reactivos intactos ($[\text{Ptr}-\text{H}]^-$, $m/z = 162.0416$ y $[\text{dT}-\text{H}]^-$, $m/z = 241.0824$). Ambos fragmentos aparecen en el espectro MS/MS a m/z 162.0419 y 241.0796 respectivamente,

aunque el que corresponde a dT presenta un error ligeramente superior a 10 ppm. Por otra parte, se puede fragmentar en el metilo de Thy, y por lo tanto, se obtendría una pterina metilada en el carbono 6 o en el 7 ($[\text{Mep-H}]^-$, $m/z = 176.0572$) y un uracilo ($[\text{dT-CH}_3\text{-H}]^-$, $m/z = 227.0668$). Este último también aparece en el espectro MS/MS, sin embargo, su error es demasiado alto (40.1 ppm) como para asignarle esa estructura al fragmento. Esto indica que en este caso la unión entre ambas moléculas no tiene lugar a través del metilo. Otra posibilidad es que la unión se dé entre los carbonos 6 o 7 de Ptr y el carbono 6 de dT (unión al anillo de la base). La estructura propuesta para este producto aparece en la [Figura 68.c](#). En la [Tabla 8](#) se resumen los fragmentos encontrados con sus correspondientes relaciones m/z , las fórmulas químicas y los errores. Los fragmentos con un error superior a 10 ppm aparecen en color rojo y no se pudieron asignar a las correspondientes estructuras.

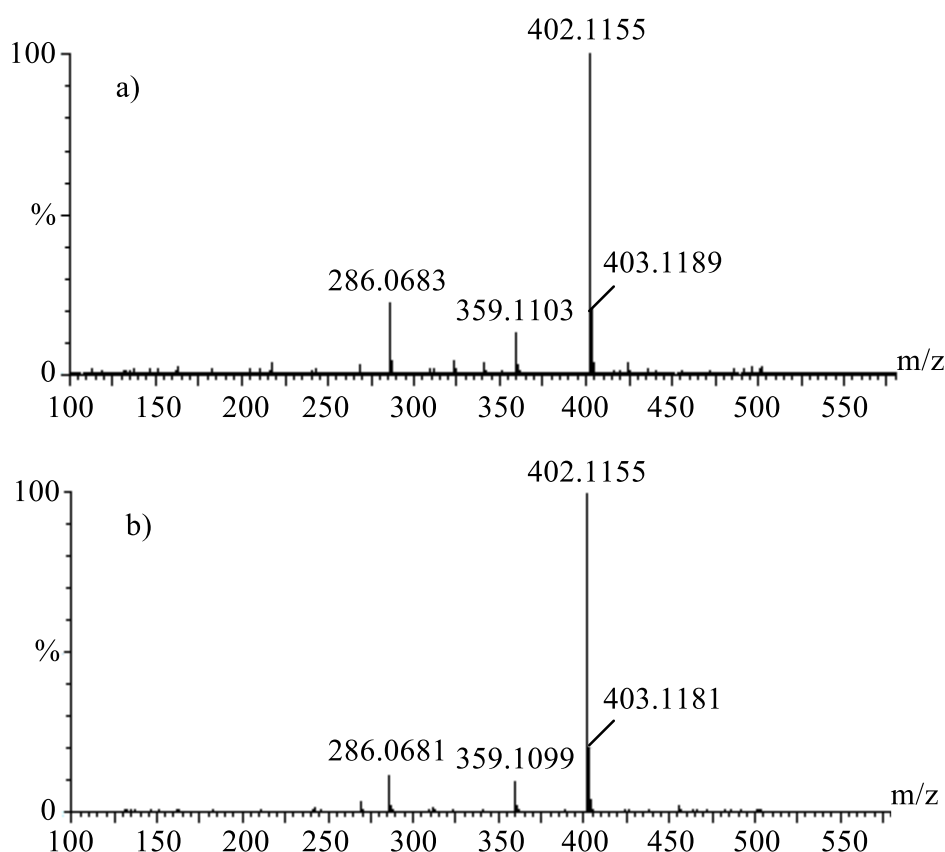


Figura 66. Espectros de masas ESI de los picos a $t_R = 1.45$ min (a) y a $t_R = 1.29$ min (b) correspondientes a los dos aductos formados en la reacción fotosensibilizada de dT en presencia de Ptr en condiciones anaeróbicas, obtenidos del cromatograma de la mezcla irradiada durante 4 h. $[\text{Ptr}]_0 = 150 \mu\text{M}$; $[\text{dT}]_0 = 1 \text{ mM}$; $\text{pH} = 5.5 \pm 0.1$. Equipo 1.

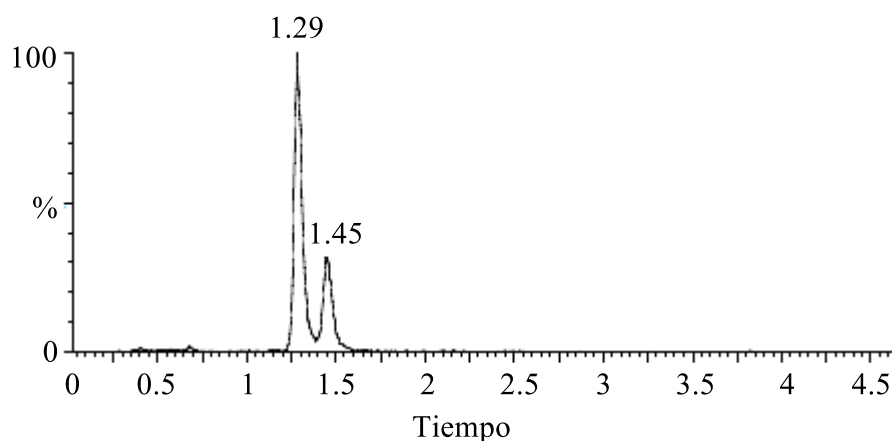


Figura 67. Cromatograma de una mezcla de dT y Ptr irradiada durante 4 h en condiciones anaeróbicas registrado con el detector de MS fijo a un valor m/z de 402.1. $[Ptr]_0 = 150 \mu M$; $[dT]_0 = 1 mM$; $pH = 5.5 \pm 0.1$. Equipo 1.

En la Figura 69 se puede ver el espectro MS/MS ESI^- del aducto que aparece a un tiempo de retención de 1.45 minutos. Parece lógico pensar que este producto pueda ser un isómero estructural del producto que aparece a un tiempo de retención menor, es decir, que uno de ellos se forme mediante la unión del carbono 6 de Ptr al anillo de dT y en el otro la unión se dé a través del carbono 7. La otra opción es que la unión se produzca entre el grupo metilo de dT y los carbonos 6 y 7 de Ptr. En el espectro MS/MS aparecen los siguientes fragmentos m/z a 286.0684 ($[Ptr+Thy-3H]^-$), 162.0412 ($[Ptr-H]^-$), 176.0564 ($[Mep-H]^-$) y 227.0645 ($[dT-CH_3-H]^-$). Por lo tanto, la fragmentación obtenida para este ion molecular confirma que la estructura del aducto consiste en la unión de Ptr al grupo metilo de dT (Figura 69.c). Los resultados se resumen en la Tabla 8.

El análisis de espectrometría de masas que se acaba de presentar permitió dilucidar la posición de la unión en la estructura de Thy, pero no se pudo dilucidar qué átomo de la estructura de Ptr participa. Parece razonable pensar que ambos picos cromatográficos en realidad contienen una mezcla de isómeros, debido a que la probabilidad de que los aductos involucren el carbono 6 o el 7 de Ptr tendría que ser bastante similar. Por una parte, el pico que aparece a un tiempo de retención de 1.29 minutos puede estar formado por una mezcla de los aductos que se generan con la unión de los carbonos 6 o 7 de Ptr al anillo de dT. Por otra parte, el pico que aparece a un tiempo de retención de 1.45 minutos puede contener una mezcla de los aductos que se forman con la unión del grupo metilo de dT a dichos carbonos de Ptr.

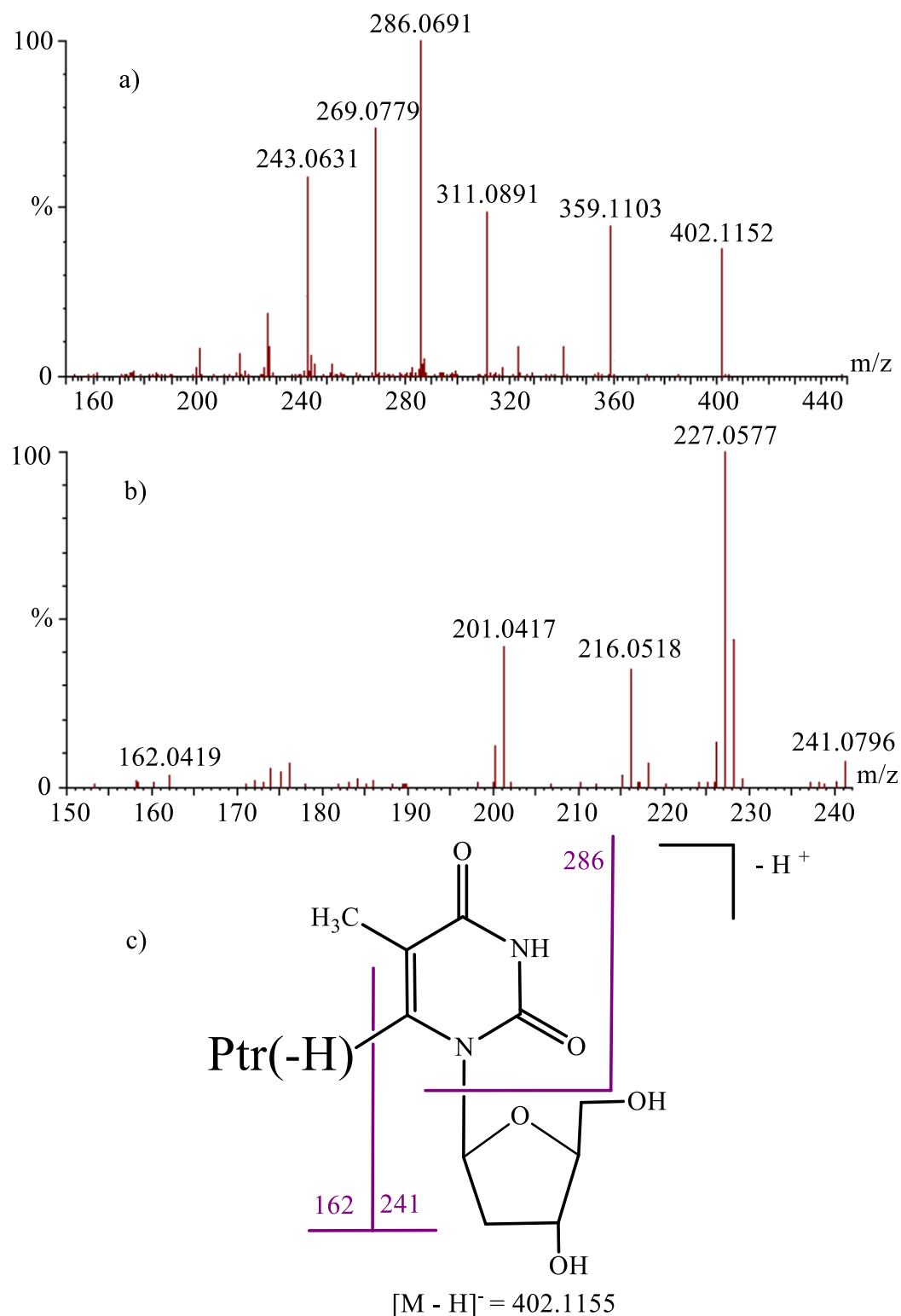


Figura 68. Espectro MS/MS ESI del ion con $m/z = 402.1155$ a $t_R = 1.29$ min. a) Escala completa (m/z entre 150 y 450); b) Ampliación del eje m/z del espectro entre 150 y 243; c) Estructura química y fragmentación propuesta para el producto. Equipo I.

Ión molecular/fragmento	Composición elemental [M-H] ⁻	m/z observada	m/z calculada	Error (ppm)
Ptr-dT(-2H) $t_R = 1.29$ min				
[Ptr+dT-3H] ⁻	C ₁₆ H ₁₆ N ₇ O ₆	402.1152	402.1162	2.5
[Ptr+Thy-3H] ⁻	C ₁₁ H ₈ N ₇ O ₃	286.0691	286.0688	1.0
[Ptr-H] ⁻	C ₆ H ₄ N ₅ O	162.0419	162.0416	1.9
[dT-CH ₃ -H] ⁻	C ₉ H ₁₁ N ₂ O ₅	227.0577	227.0668	40.1
[dT-H] ⁻	C ₁₀ H ₁₃ N ₂ O ₅	241.0796	241.0829	13.7
Ptr-dT(-2H) $t_R = 1.45$ min				
[Ptr+dT-3H] ⁻	C ₁₆ H ₁₆ N ₇ O ₆	402.1146	402.1162	3.9
[Ptr+Thy-3H] ⁻	C ₁₁ H ₈ N ₇ O ₃	286.0684	286.0688	1.4
[Ptr-H] ⁻	C ₆ H ₄ N ₅ O	162.0412	162.0416	2.5
[Mep-H] ⁻	C ₇ H ₆ N ₅ O	176.0564	176.0572	4.5
[dT-CH ₃ -H] ⁻	C ₉ H ₁₁ N ₂ O ₅	227.0645	227.0668	10.1
Mep-dT(-2H)				
[Mep+dT-3H] ⁻	C ₁₇ H ₁₈ N ₇ O ₆	416.1298	416.1324	6.2
[Mep+Thy-3H] ⁻	C ₁₂ H ₁₀ N ₇ O ₃	300.0841	300.0851	3.3
[Mep-H] ⁻	C ₇ H ₆ N ₅ O	176.0544	176.0578	19.3
[Dmp-H] ⁻	C ₈ H ₈ N ₅ O	190.0727	190.0734	3.7
[dT-H] ⁻	C ₁₀ H ₁₃ N ₂ O ₅	241.0740	241.0829	37.0

Tabla 8. Relaciones m/z observadas y calculadas, fórmulas químicas y errores de los principales fragmentos obtenidos en el análisis MS/MS. Equipo 1.

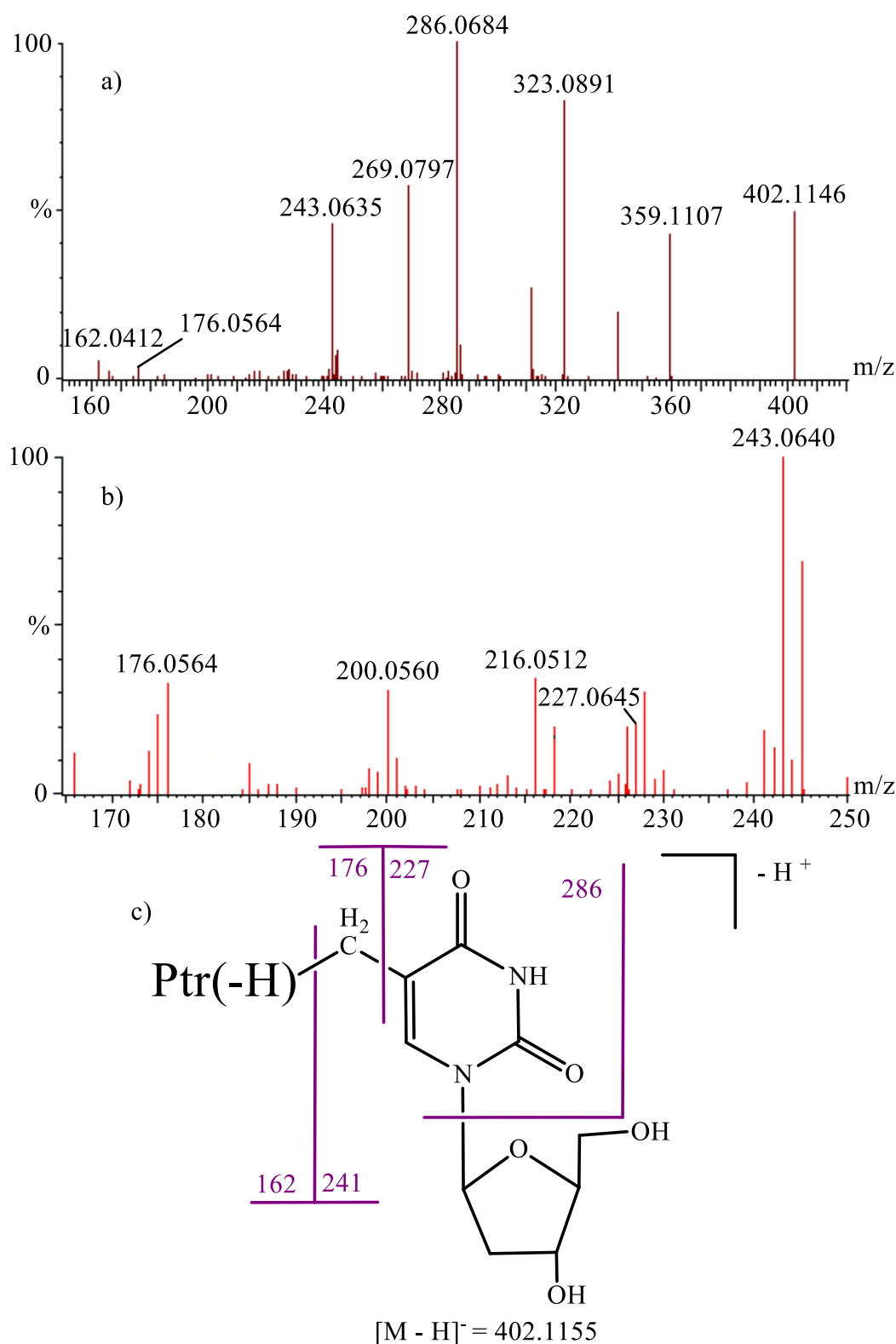


Figura 69. Espectro MS/MS ESI del ion con $m/z = 402.1155$ a $t_R = 1.45$ min. a) Escala completa (m/z entre 150 y 420); b) Ampliación del eje m/z del espectro entre 165 y 250; c) Estructura química y fragmentación propuesta para el producto. Equipo 1.

10.1.1. Generación de aductos con otros fotosensibilizadores

Con el fin de obtener más información sobre la posición de unión en la estructura de Ptr, se realizaron experimentos utilizando otros fotosensibilizadores: 6-metilpterina (Mep) y 6,7-dimetilpterina (Dmp). Los grupos metilos en los carbonos 6 y 7 del anillo pterínico (Figura 70, Capítulo 3) impiden la unión del nucleósido en dichas posiciones. Se trabajó con la misma metodología que anteriormente, a excepción de la concentración de los fotosensibilizadores, dado que las pterinas metiladas presentan menor solubilidad en agua. El estudio se realizó con disoluciones con la misma absorbancia a la longitud de onda máxima de emisión de la lámpara ($A_{350\text{ nm}} = 0.25$). El análisis de los cromatogramas de las muestras irradiadas, reveló que cuando se utiliza Dmp como fotosensibilizador no se forman productos que absorban entre 300 y 400 nm. Sin embargo, cuando se usa Mep se genera un único producto y no dos como ocurría con Ptr, cuyo espectro de absorbancia es similar al del fotosensibilizador.

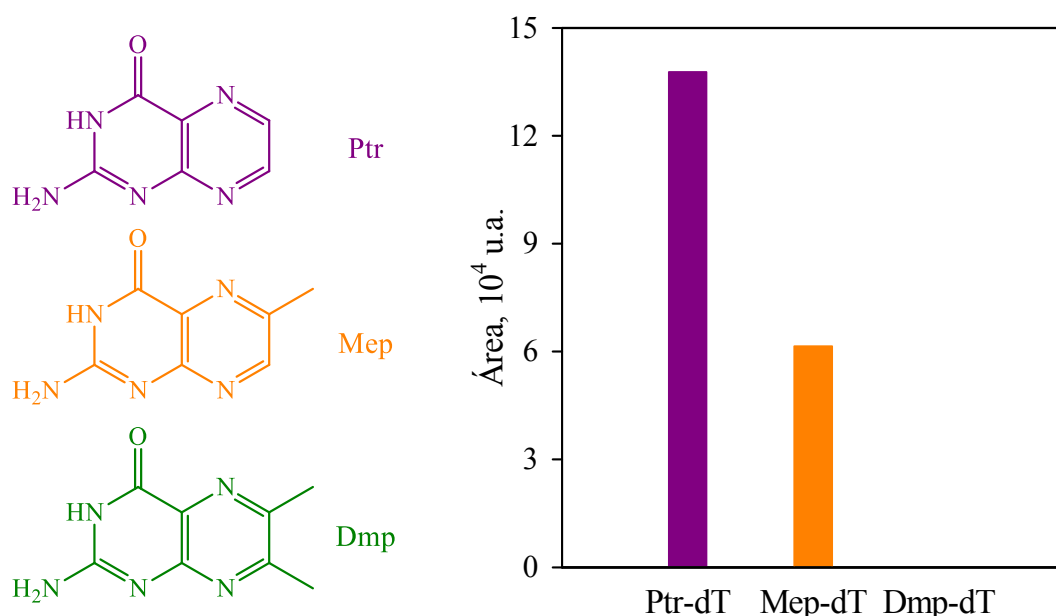


Figura 70. Comparación del área de los picos cromatográficos de los aductos generados después de 4 horas de irradiación de disoluciones acuosas de dT en presencia de Ptr, Mep o Dmp bajo condiciones anaeróbicas. Absorbancia sensibilizador (350 nm) = 0.25; $[dT]_0 = 1\text{ mM}$; $pH = 5.5 \pm 0.1$.

Este hecho confirma que la unión entre Ptr y dT tiene lugar a través de los carbonos 6 y 7 del fotosensibilizador, como se había propuesto previamente. Además, la obtención de un único pico cromatográfico al utilizar Mep con respecto a los dos picos obtenidos al usar Ptr, se puede explicar por los impedimentos estéricos ocasionados por los grupos metilo. Es decir, cuando se usa Mep, se pueden dar impedimentos espaciales entre el metilo de la base y el del fotosensibilizador, y por lo tanto, no se forma el aducto en el que el sensibilizador se une directamente al anillo de dT.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, el aducto Mep-dT se formaría por la unión del metilo de dT a la posición 7 del anillo pterínico. El área a 340 nm del pico cromatográfico de este producto es aproximadamente el 45 % de su análogo de Ptr (Figura 70). Esta disminución (aproximadamente la mitad) nos permite suponer que el pico del aducto Ptr-dT a $t_R = 1.45$ minutos contiene una mezcla de los isómeros unidos a través de los carbonos 6 y 7 de Ptr. Como en principio la probabilidad de generar ambos isómeros es la misma, parece lógico que al bloquear una de las posiciones se obtenga menos cantidad de aducto.

Para confirmar la hipótesis se realizó un análisis de espectrometría de masas ESI⁻ de las mezclas de Mep y dT (Equipo 1). El cromatograma de la disolución sin irradiar presenta tres picos cromatográficos a unos tiempos de retención de 0.62, 1.52 y 1.94 minutos (Figura 71.a). Como se mencionó en el apartado anterior, el primero se debe a una impureza polimérica que proviene del equipo, mientras que los otros dos se corresponden a los iones moleculares intactos de Mep y dT, con unas masas de 176.0578 y 241.0821 Da respectivamente (Figura 72). En el cromatograma de la mezcla irradiada durante 4 horas en ausencia de O₂ aparece un pico nuevo a 3.15 minutos, tiempo de retención mayor que el de los reactivos (Figura 71.b). Este pico presenta una masa de 416.1328 Da (Figura 73), que corresponde a la suma de las masas del sensibilizador y el sustrato ([Mep+dT-3H]⁻).

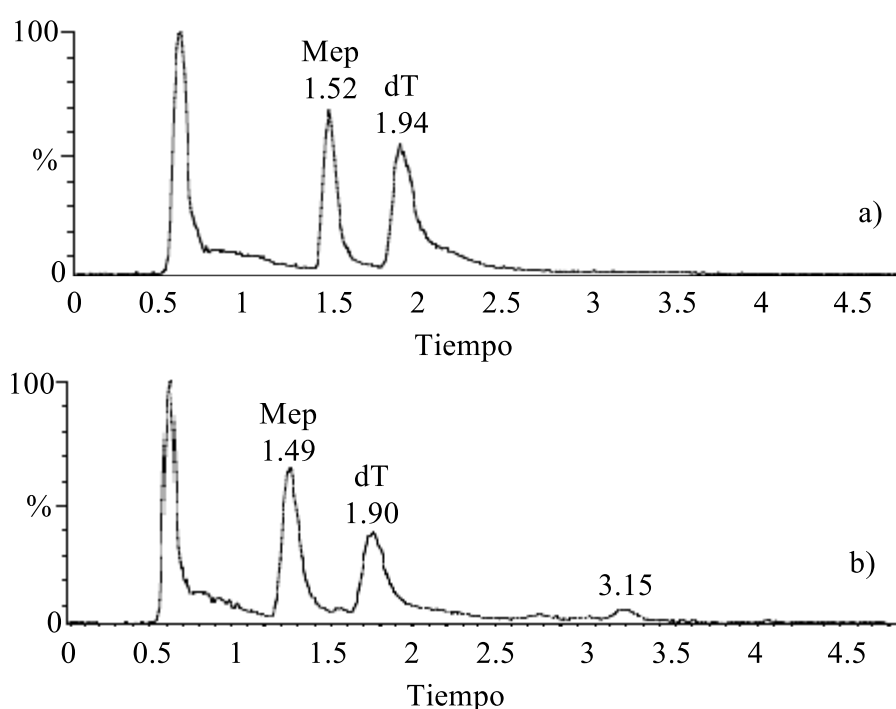


Figura 71. Cromatogramas registrados en el UPLC de mezclas de Mep y dT sin irradiar (a) y después de 4 h de irradiación en condiciones anaeróbicas (b). $A_{350\text{ nm}}$ Mep = 0.25; $[dT]_0 = 1\text{ mM}$; $pH = 5.5 \pm 0.1$. Equipo 1.

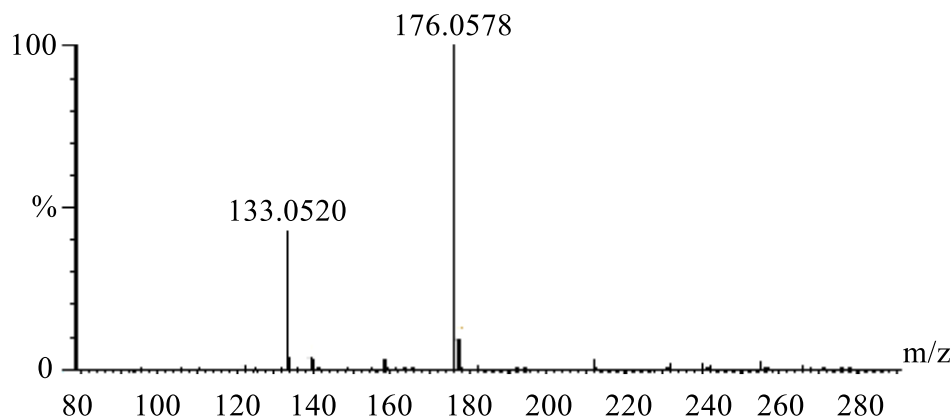


Figura 72. Espectro de masas ESI del pico a $t_R = 1.52$ min correspondiente a Mep, obtenido del cromatograma de la mezcla sin irradiar. $A_{350\text{ nm}} \text{ Mep} = 0.25$; $[dT]_0 = 1\text{ mM}$; $\text{pH} = 5.5 \pm 0.1$. Equipo 1.

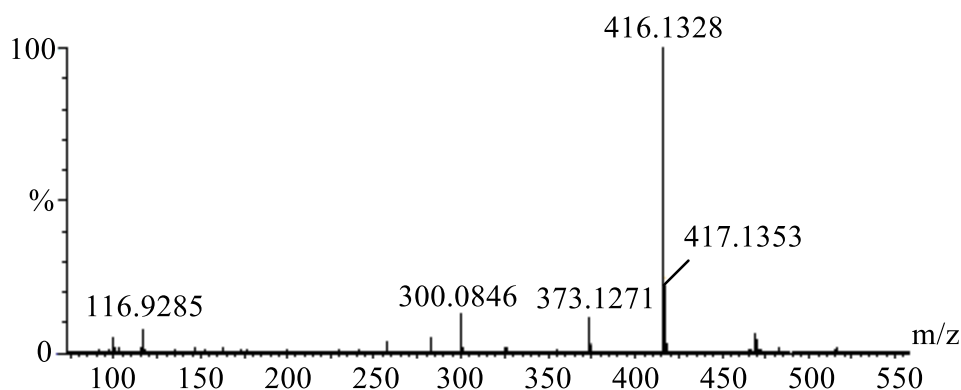


Figura 73. Espectro de masas ESI del pico a $t_R = 3.15$ min correspondiente al aducto formado en la reacción fotosensibilizada de dT en presencia de Mep en condiciones anaeróbicas, obtenido del cromatograma de la mezcla irradiada durante 4 h. $A_{350\text{ nm}} \text{ Mep} = 0.25$; $[dT]_0 = 1\text{ mM}$; $\text{pH} = 5.5 \pm 0.1$. Equipo 1.

El espectro MS/MS del producto (Figura 74.a) muestra una señal intensa con m/z a 300.0841, que se puede atribuir al fragmento que contiene Mep y dT ($[\text{Mep}+\text{Thy}-3\text{H}]^-$). Si tenemos en cuenta la estructura propuesta en la Figura 69.c para el aducto Ptr-dT, los fragmentos esperados son los correspondientes a los reactivos ($[\text{Mep}-\text{H}]^-$, $m/z = 176.0578$ y $[\text{dT}-\text{H}]^-$, $m/z = 241.0824$). Si se fragmenta el enlace que une el anillo de dT con el grupo metilo de la misma se obtendría Dmp ($[\text{Dmp}-\text{H}]^-$, $m/z = 190.0734$) y uracilo ($[\text{dT}-\text{CH}_3-\text{H}]^-$, $m/z = 227.0668$). Los fragmentos correspondientes a los reactivos se ven, pero con demasiado error como para considerarlos válidos. Sin embargo, se observa el fragmento $[\text{Dmp}-\text{H}]^-$ con m/z a 190.0727 (Figura 74.b), que confirma la estructura propuesta para este aducto (Figura 74.c). Estos resultados aparecen resumidos en la Tabla 8.

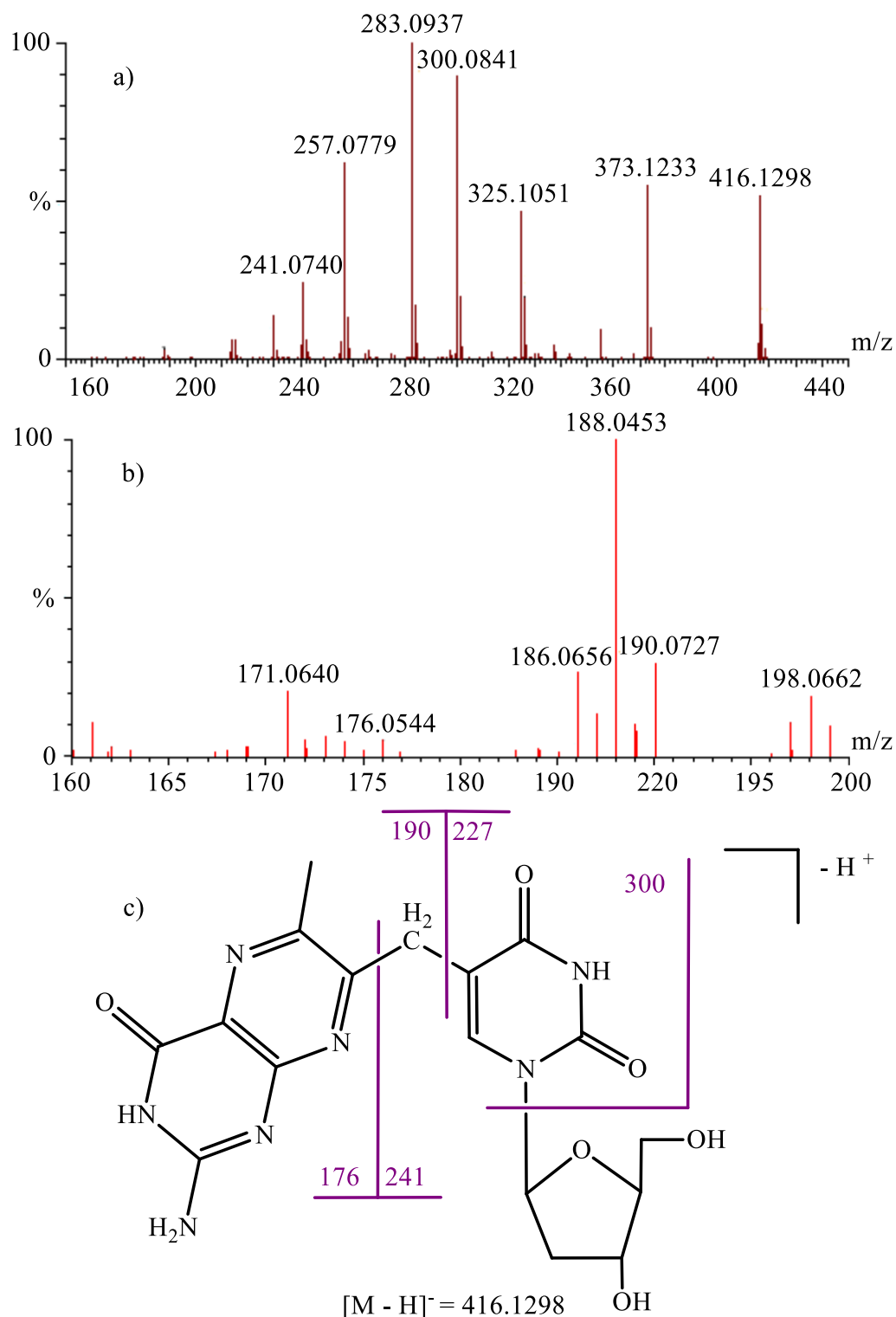


Figura 74. Espectro MS/MS ESI⁻ del ion con $m/z = 416.1328$ a $t_R = 3.15$ min. a) Escala completa (m/z entre 150 y 450); b) Ampliación del eje m/z del espectro entre 160 y 200; c) Estructura química y fragmentación propuesta para el producto. Equipo I.

10.2. ANÁLISIS DEL ADUCTO PTERINA–CITIDINA POR UPLC-MS

Como se mencionó en el capítulo anterior ([Apartado 9.1](#)), la irradiación de disoluciones de Ptr y dCMP, a pH 5.5 y en ausencia de O₂, genera varios productos que presentan espectros de absorbancia similares al de Ptr ([Figura 59](#)) y emisión a 450 nm cuando se les excita a 350 nm ([Inset Figura 57.b](#)). Se realizó un análisis de espectrometría de masas con el nucleósido de Cyt (dC) tanto en modo negativo como en modo positivo (Equipo 2). A diferencia del caso anterior, los resultados presentan mejor definición en modo positivo.

El aducto Ptr–dC debería tener un peso molecular de 388.3381 g/mol y su fórmula química sería C₁₅H₁₆N₈O₅. En el cromatograma con el detector de masas a un valor fijo de m/z 389.13 ([Ptr+dC–H]⁺) aparecen dos picos principales a 2.06 y 3.22 minutos ([Figura 75](#)). Estos picos en realidad parecen picos dobles, es decir, puede que cada pico contenga dos compuestos que no se hayan logrado separar bien. Si tenemos en cuenta el estudio previo de espectrometría de masas realizado para el aducto originado con dT, se puede realizar el siguiente análisis. La estructura química de dC carece del grupo metilo que posee dT en el carbono 5 (C5) de la base ([Figura 4](#)). Por lo tanto, tiene dos posiciones libres sobre el anillo (C5 y C6). Teniendo en cuenta que Ptr también presenta dos posiciones posibles para la formación del aducto, se puede pensar que uno de los picos contiene una mezcla de los aductos generados por la unión de C6 y C7 de Ptr al C5 de la base, y el otro, contiene la mezcla de los aductos que se unen a través de C6 y C7 de Ptr al C6 de la base.

Para tratar de dilucidar la estructura de estos productos se realizó un análisis MS/MS ESI⁺ de los picos cromatográficos registrados a 2.06 y 3.22 minutos ([Figuras 76 y 77](#)). Los espectros MS/MS ESI⁺ se registraron tras aplicar un voltaje de 12 V, donde se ve el ion molecular, y de 20 V para observar los fragmentos generados. En los dos casos aparece el ion molecular [Ptr+dC–H]⁺ con m/z a 389.1333 y 389.1322, y el fragmento [Ptr+Cyt–H]⁺ con m/z a 273.0848 y 273.0845. Esto permite confirmar la formación de aductos Ptr–dC. Se obtuvieron otros fragmentos que corresponden a estructuras conocidas, concretamente, [Cyt+H]⁺ (m/z 112.0507 – 112.0500), [Ptr+H]⁺ (m/z 164.0571), [dC+H]⁺ (m/z 228.0977) y otros fragmentos de pérdidas típicas en las bases, como [Ptr+Cyt–NH₃–H]⁺ (m/z 256.0569 – 256.0577) y [Ptr+Cyt–CONH–H]⁺ (m/z 230.0762 – 230.0782). La [Figura 78](#) muestra la estructura propuesta para los aductos Ptr–dC y su fragmentación. En la [Tabla 9](#) se resumen los resultados obtenidos.

Esta información no es suficiente para realizar la caracterización estructural completa de estos productos como se hizo con los aductos de dT. Sin embargo, es posible confirmar que estos productos son aductos en los que Ptr se une directamente a la base del nucleósido, aunque no se puede especificar el punto exacto de unión. Para poder dilucidar las estructuras es necesario realizar estudios con diferentes técnicas, como resonancia magnética nuclear o espectroscopía de infrarrojo.

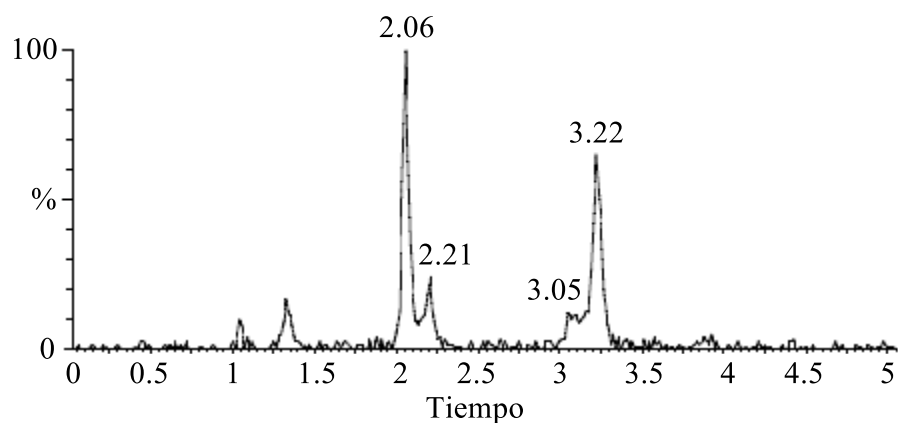


Figura 75. Cromatograma de una disolución de dC y Ptr irradiada durante 3 h en condiciones anaeróbicas registrado con el detector de MS fijo a un valor de $m/z = 389.13$. $[Ptr]_0 = 150 \mu M$; $[dC]_0 = 1 \text{ mM}$; $pH = 5.5 \pm 0.1$. Equipo 2.

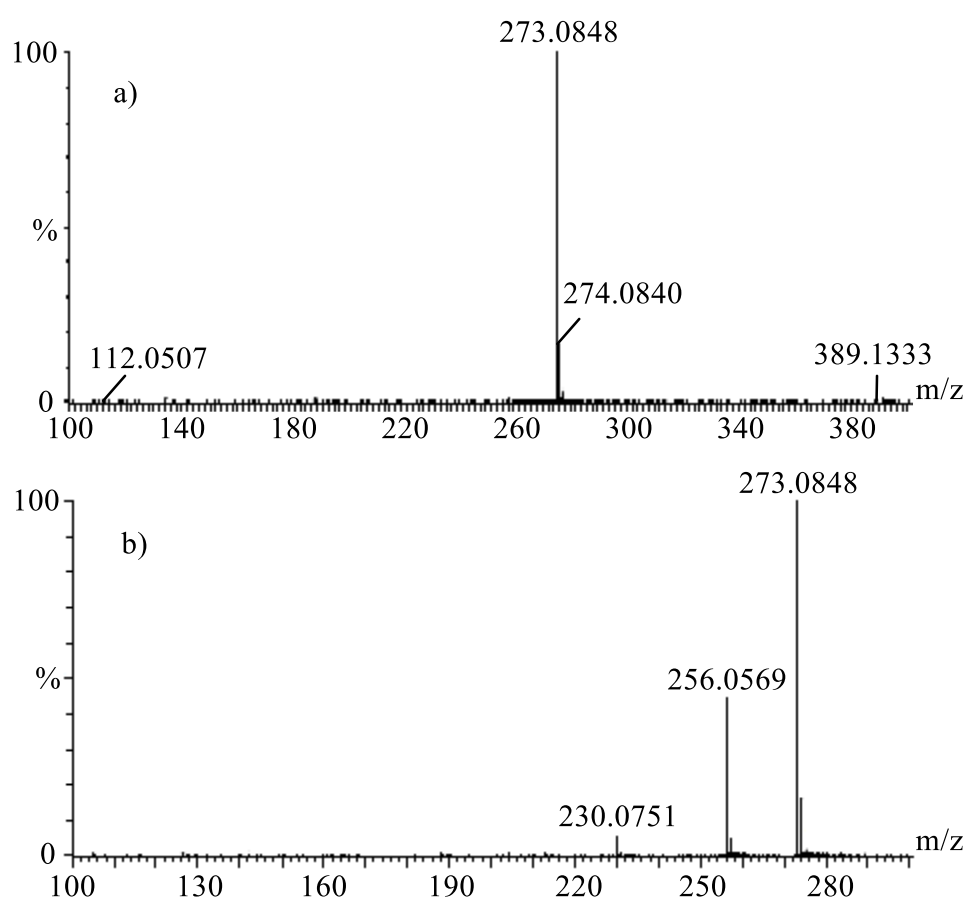


Figura 76. Espectro MS/MS ESI^+ del ion con $m/z = 389.13$ a $t_R = 2.06 \text{ min}$. Voltaje: (a) 12 V y (b) 20 V. Equipo 2.

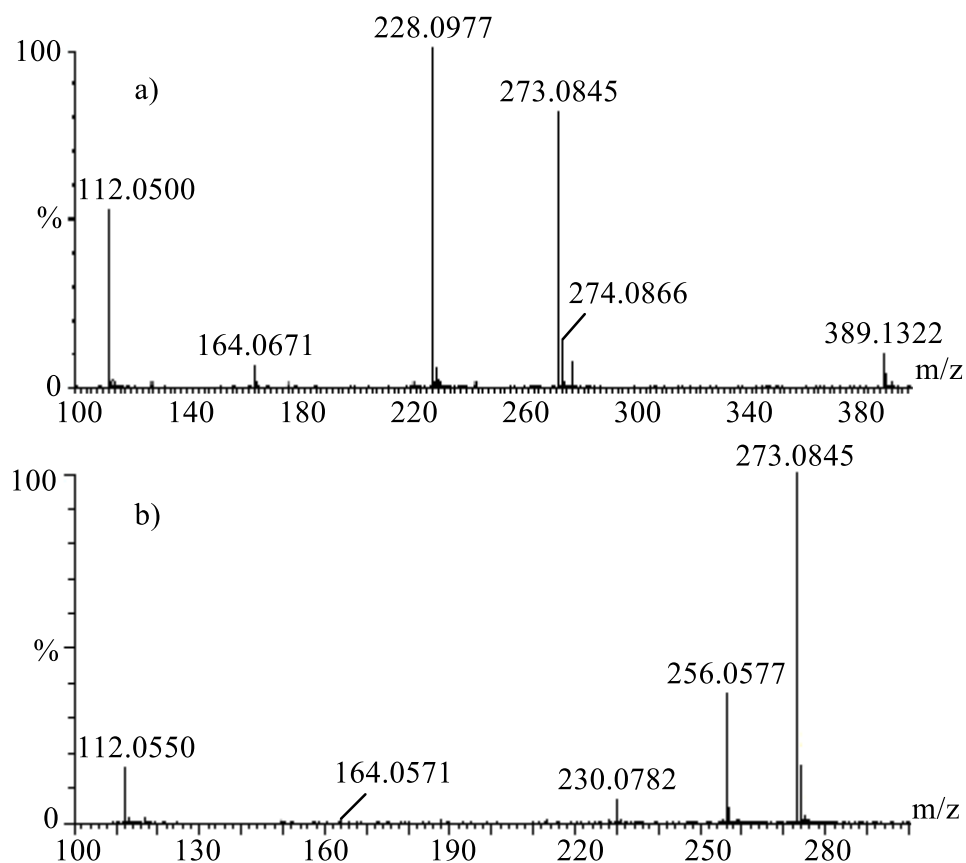


Figura 77. Espectro MS/MS ESI^+ del ion con $m/z = 389.13$ a $t_R = 3.22$ min. Voltaje: (a) 12 V y (b) 20 V. Equipo 2.

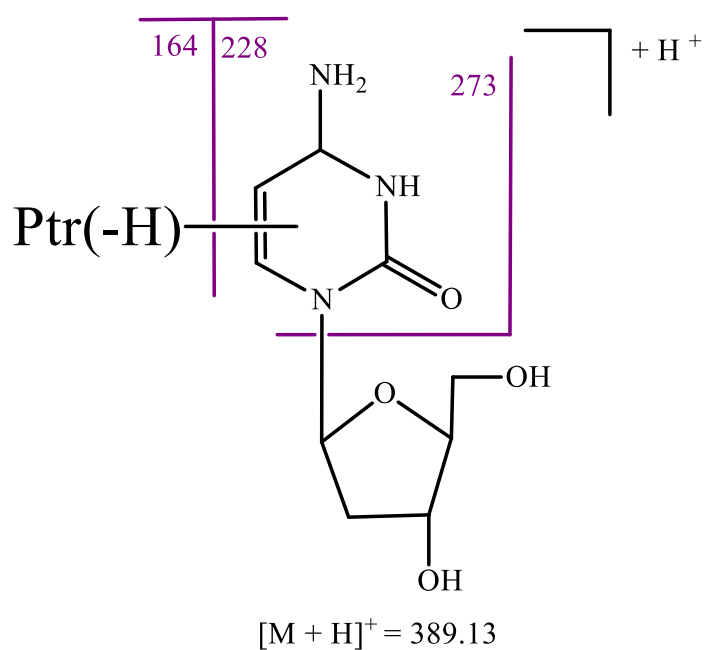


Figura 78. Estructura propuesta y fragmentación de los aductos $Ptr-dC$.

Ión molecular/fragmento	Composición elemental [M+H] ⁺	m/z observada	m/z calculada	Error (ppm)
Ptr-dC(-2H)_t_R = 2.06 min				
[Ptr+dC-H] ⁺	C ₁₅ H ₁₇ N ₈ O ₅	389.1333	389.1322	2.8
[Ptr+Cyt-H] ⁺	C ₁₀ H ₉ N ₈ O ₂	273.0848	273.0848	0
[Ptr+Cyt-NH ₃ -H] ⁺	C ₁₀ H ₆ N ₇ O ₂	256.0569	256.0583	5.5
[Ptr+Cyt-CONH-H] ⁺	C ₉ H ₈ N ₇ O	230.0762	230.0790	12.2
[Cyt+H] ⁺	C ₄ H ₆ N ₃ O	112.0507	112.0511	3.6
Ptr-dC(-2H)_t_R = 3.22 min				
[Ptr+dC-H] ⁺	C ₁₅ H ₁₇ N ₈ O ₅	389.1322	389.1322	0
[Ptr+Cyt-H] ⁺	C ₁₀ H ₉ N ₈ O ₂	273.0845	273.0848	1.1
[Ptr+Cyt-NH ₃ -H] ⁺	C ₁₀ H ₆ N ₇ O ₂	256.0577	256.0583	2.3
[Ptr+Cyt-CONH-H] ⁺	C ₉ H ₈ N ₇ O	230.0782	230.0790	3.5
[dC+H] ⁺	C ₉ H ₁₄ N ₃ O ₄	228.0977	228.0984	3.1
[Cyt+H] ⁺	C ₄ H ₆ N ₃ O	112.0500	112.0511	9.8
[Ptr+H] ⁺	C ₆ H ₆ N ₅ O	164.0571	164.0572	0.6

Tabla 9. Relaciones m/z observadas y calculadas, fórmulas químicas y errores de los principales fragmentos obtenidos en el análisis MS/MS. Equipo 2.

11. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN FOTOFÍSICA DEL ADUCTO PTERINA-TIMIDINA

El objetivo de este capítulo es aislar y describir las propiedades fotofísicas del aducto Ptr-dT mayoritario. El aislamiento del aducto se llevó a cabo mediante HPLC. Su caracterización fotofísica se realizó con el registro de los espectros de absorbancia, emisión y excitación, tiempo de vida de fluorescencia (τ_F), rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_F) y rendimiento cuántico de generación de oxígeno singlete (Φ_Δ).

11.1. AISLAMIENTO DEL ADUCTO

Con el fin de maximizar la cantidad de aducto obtenido se realizaron diferentes pruebas en las que se modificaron los tiempos de irradiación y las concentraciones de los reactivos. Las condiciones óptimas encontradas fueron irradiar durante 3 horas disoluciones de Ptr y dT con concentraciones de 150 μ M y 1 mM, respectivamente, empleando el [Sistema de irradiación I](#).

Una vez optimizadas las condiciones experimentales para obtener la mayor cantidad de producto, se realizaron varias irradiaciones en dichas condiciones. Las mezclas irradiadas se inyectaron en el HPLC y se aisló el aducto con tiempo de retención de 11.2 minutos de forma pura. El producto se aisló manualmente a la salida del PDA ([Apartado 6.2.1](#)). Para obtener la concentración máxima se recolectó una fracción muy estrecha centrada en el máximo del pico cromatográfico ([Figura 79](#)). Se repitió el procedimiento, se juntaron todas las disoluciones recolectadas y se evaluó su pureza por HPLC ([Figura 80](#)).

Para saber cuál es la estructura del aducto aislado, debe hacerse una comparación de los cromatogramas obtenidos por HPLC y por UPLC. Como mencionábamos anteriormente, los tiempos de retención obtenidos con el HPLC no coinciden con los del UPLC. Debido a ello, tenemos que guiarnos por el orden de elución de los compuestos. Si nos fijamos detenidamente en un cromatograma a 340 nm del HPLC, podemos ver que después del pico del aducto recolectado ($t_R = 11.2$ minutos) aparece otro producto con una intensidad baja ($t_R = 14.1$ minutos), pero que también muestra las propiedades espectroscópicas del fotosensibilizador ([Figura 79](#)). Esto es lo mismo que ocurre con los cromatogramas de UV obtenidos en el UPLC. Al comparar las medidas realizadas con ambos equipos se puede apreciar que tanto en el cromatograma a 340 nm obtenido con el HPLC ([Figura 79](#)) como en el cromatograma de UV obtenido con el UPLC-MS, el pico de menor tiempo de retención es bastante más intenso. Por lo tanto, podemos especular que el aducto con $t_R = 11.2$ minutos que se aisló del

HPLC para realizar la caracterización fotofísica se corresponde con el de $t_R = 1.29$ minutos observado en el estudio de espectrometría de masas (Figura 68.c).

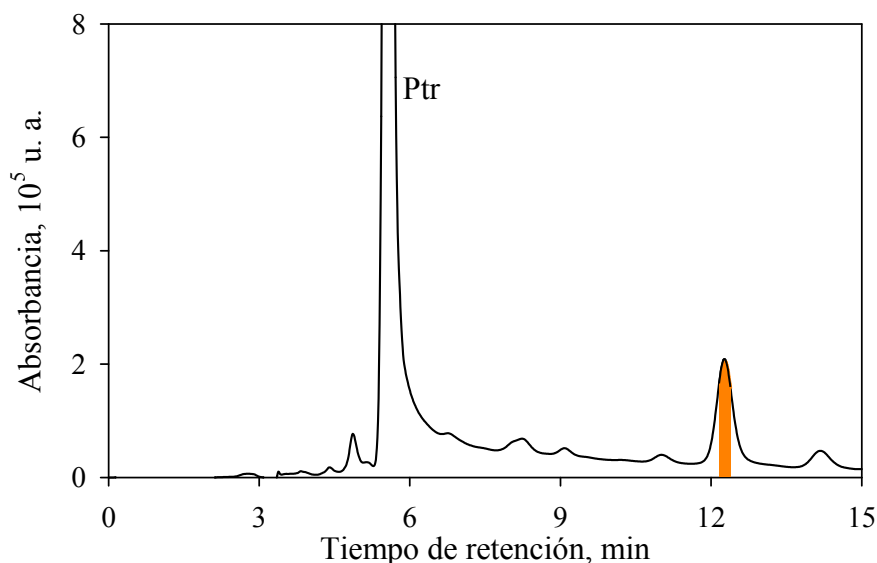


Figura 79. Cromatograma registrado con el PDA a $\lambda = 340$ nm de una mezcla de Ptr y dT irradiada en ausencia de O_2 durante 3 horas. El área coloreada representa la fracción del producto aislada. $[Ptr]_0 = 150 \mu M$, $[dT]_0 = 1$ mM, $pH = 5.5 \pm 0.1$.

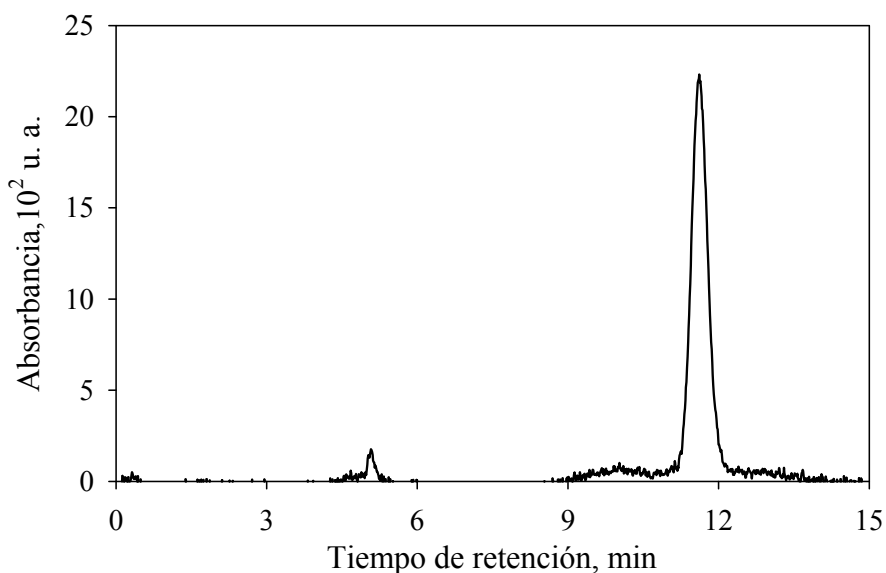


Figura 80. Cromatograma registrado con el PDA a $\lambda = 340$ nm del producto aislado.

Antes de proceder a la caracterización, fue necesario concentrar el aducto. Para ello, se hizo pasar una corriente de nitrógeno sobre la superficie de la disolución, la cual se mantuvo con agitación para favorecer la evaporación del disolvente. Para realizar las medidas de detección de 1O_2 , fue necesario llevar la

disolución a sequedad total para, posteriormente, disolver el sólido en D₂O. Una vez concentrado el producto, se volvió a inyectar una pequeña cantidad en el HPLC para comprobar que no se había degradado el compuesto. Controles espectrales y de HPLC revelaron que el compuesto es estable en disolución acuosa durante al menos 10 días cuando se guarda a 4 °C en oscuridad (Figura 81).

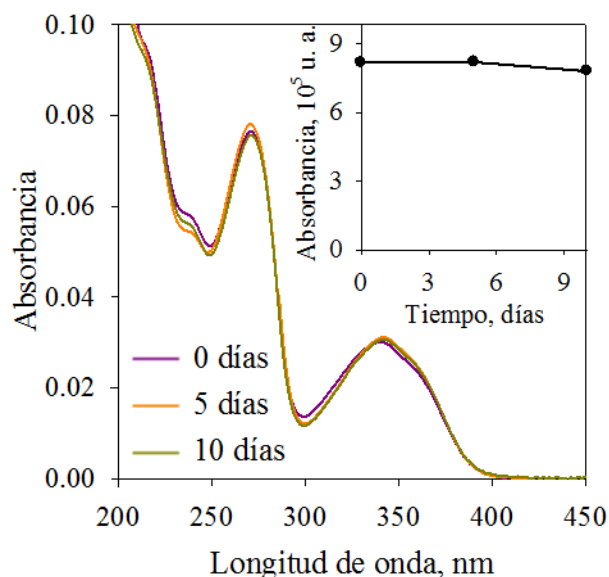


Figura 81. Espectros de absorbancia y área obtenida de los cromatogramas registrados con el HPLC-PDA a $\lambda = 340$ nm del aducto aislado después de varios días almacenado a 4 °C en oscuridad.

11.2. CARACTERIZACIÓN FOTOFÍSICA DEL ADUCTO

Se registraron los espectros de absorbancia, emisión y excitación y se determinó el tiempo de vida de fluorescencia del aducto purificado en disolución acuosa a pH 5.5. Todos los parámetros se compararon con los obtenidos para una disolución de Ptr en condiciones idénticas e igual absorbancia a la longitud de onda de excitación.

11.2.1. Espectro de absorbancia

El espectro de absorbancia del aducto presenta la banda de absorción típica de las pterinas, centrada aproximadamente a 340 nm (Tabla 10, Figura 82). Este espectro debería de coincidir con la suma de los espectros de Ptr y dT. Cuando representamos este espectro suma junto con el espectro del aducto obtenido experimentalmente, ambos normalizados a 340 nm, se puede ver que no coinciden

exactamente (Figura 82). La banda de mayor energía del espectro del aducto no es tan intensa como la obtenida en el espectro calculado. Sin embargo, si integramos ambos espectros para calcular el área de debajo de la curva se obtiene un resultado muy similar para ambos (la diferencia es menos del 5 %). Esto se debe a un desplazamiento del máximo de la banda de mayor energía de la porción pterínica hacia mayores longitudes de onda en el espectro de absorción del aducto, si se compara con el de Ptr. Además, se produce un leve ensanchamiento de la misma.

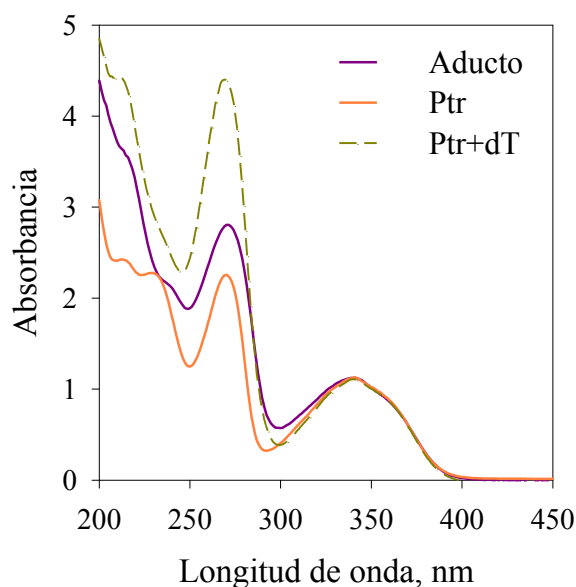


Figura 82. Espectros de absorción normalizados en el máximo de la banda de menor energía del aducto (línea morada) y de Ptr (línea naranja). La línea verde discontinua representa el espectro teórico calculado con la suma de los espectros de Ptr y dT, también normalizado a 340 nm.

	Ptr	Aducto
Absorción ($\lambda_{\text{máx}}$, nm)	340 ± 1	340 ± 1
Emisión ($\lambda_{\text{máx}}$, nm)	440 ± 1	437 ± 1
Φ_F	0.32 ± 0.01	0.29 ± 0.02
τ_F, ns	7.6 ± 0.4	7.2 ± 0.4
Φ_A	0.18 ± 0.02	0.07 ± 0.01

Tabla 10. Propiedades fotofísicas de Ptr y del aducto.

11.2.2. Fluorescencia

El espectro de emisión del aducto (Tabla 10, Figura 83) presenta su máximo a 437 nm. Este espectro es prácticamente idéntico al de Ptr, cuyo máximo está centrado a 440 nm. Estas medidas se realizaron en el espectrofluorímetro FluoroLog (Apartado 7.1), utilizando como fuente de excitación la lámpara de Xe con el monocromador de excitación posicionado a 350 nm, longitud de onda a la cual ambas disoluciones tenían la misma absorbancia. A partir de estas medidas, y tomando a Ptr como referencia ($\Phi_{F, \text{Ref}} = 0.32$), se realizó el cálculo para la obtención del Φ_F del aducto con la Ecuación 17 (Apartado 7.1.2). El valor obtenido fue 0.29, el cual es muy similar al de Ptr (Tabla 10).

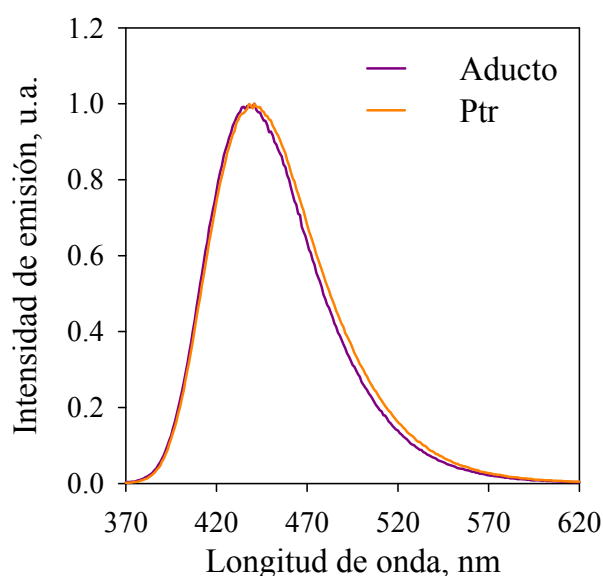


Figura 83. Espectros de emisión normalizados ($\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$) del aducto (línea morada) y de Ptr (línea naranja).

Los decaimientos de emisión de fluorescencia también se midieron en el espectrofluorímetro FluoroLog, utilizando un nanoled de 341 nm como fuente de excitación. Se registró la emisión fluorescente en función del tiempo a 440 nm. Las señales obtenidas se ajustaron monoexponencialmente, obteniendo un tiempo de vida para el aducto de 7.2 ns (Tabla 10, Figura 84), similar al reportado previamente para Ptr (7.6 ns) [Lorente, 2006].

Estas similitudes entre las propiedades de emisión del aducto y de Ptr sugieren que la nucleobase no afecta al estado excitado singlete del fotosensibilizador.

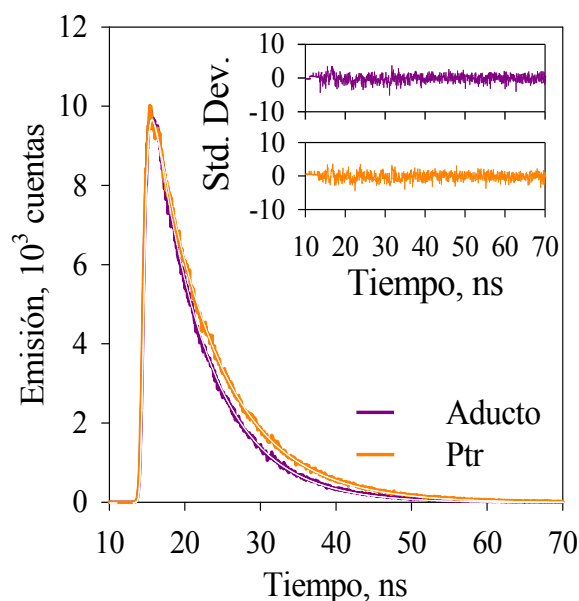


Figura 84. Decaimientos de fluorescencia ($\lambda_{em} = 440$ nm) del aducto (línea morada) y de Ptr (línea naranja).

Se registraron los espectros de excitación, excitando a las muestras con longitudes de onda comprendidas entre 260 y 430 nm. La emisión de fluorescencia se registró a 440 nm. En la Figura 85 pueden observarse los espectros de excitación del aducto y de Ptr, que son muy similares.

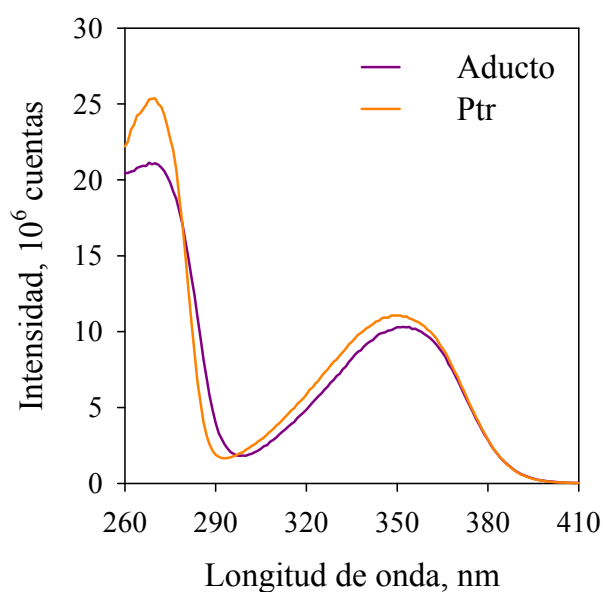


Figura 85. Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 440$ nm) del aducto (línea morada) y de Ptr (línea naranja).

Un aspecto interesante a evaluar desde el punto de vista biológico, es estudiar si el aducto puede generar $^1\text{O}_2$ tal y como lo hace Ptr cuando se encuentra libre en

disolución ($\Phi_{\Delta} = 0.18$ a pD 5.9) [Thomas, 2003]. El aducto seco se disolvió en D_2O a pD 5.9 y se irradió a 350 nm. Como se detalló en el [Apartado 7.1.4](#), el 1O_2 presenta un espectro de infrarrojo característico, con su máximo centrado a 1270 nm. Se observó una señal centrada en 1270 nm correspondiente a esta especie reactiva de oxígeno ([Figura 86](#)). Con la [Ecuación 25 26](#) ([Apartado 7.1.4](#)) y utilizando como referencia una disolución de Ptr preparada en condiciones idénticas, se calculó un Φ_{Δ}^{ap} de 0.07. Este valor indica que bajo irradiación, el aducto es capaz de producir 1O_2 , pero su eficiencia es menor en comparación con la de Ptr. Esta propiedad del aducto nos lleva a pensar que puede actuar como un fotosensibilizador intrínseco en la macromolécula de ADN, por lo que parece interesante realizar un estudio acerca de su formación en sistemas más complejos así como de su capacidad fotosensibilizadora.

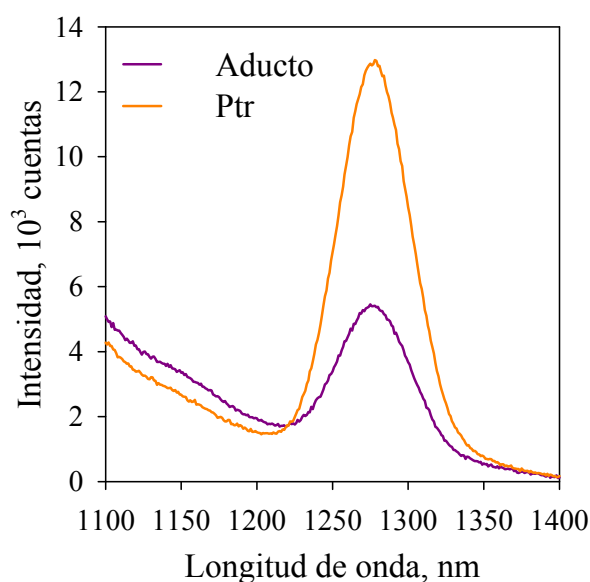


Figura 86. Espectro de emisión del infrarrojo cercano de una disolución en D_2O equilibrada en aire. Misma absorbancia a 350 nm de los dos compuestos a pD 5.9. Aducto: línea morada, Ptr: línea naranja.

12. GENERACIÓN FOTOQUÍMICA DE ADUCTOS FLUORESCENTES EN OLIGONUCLEÓTIDOS

En el presente capítulo se pretende estudiar si los aductos Ptr-dT y Ptr-dC se generan también cuando las bases pirimidínicas forman parte de una cadena de nucleótidos, comparar la eficacia del proceso bajo diferentes condiciones experimentales y estudiar las propiedades de los fotoproductos obtenidos. Para ello se trabajó con oligonucleótidos de hebra simple y cadena corta (5 bases) de diferentes secuencias. El estudio principal se llevó a cabo con un oligonucleótido que sólo contiene Thy (dT₅). También se trabajó con un oligonucleótido de Cyt (dC₅) y con otros que contienen cuatro bases de Thy y una de Gua (GTTTT y TTGTT). A modo de control se trabajó con un oligonucleótido de Gua (dG₅). Por último, se estudió la generación de aductos en oligonucleótidos de cadena doble (dT₁₀ – dA₁₀).

12.1. FOTOSENSIBILIZACIÓN DE UN OLIGONUCLEÓTIDO DE TIMINA INDUCIDA POR PTERINA EN AUSENCIA DE O₂

Se prepararon disoluciones acuosas de Ptr y el oligonucleótido dT₅ (secuencia 5'-d(TTTTT)-3') a pH 5.5 y se irradiaron en ausencia de O₂ a 350 nm ([Sistema de irradiación I](#)) durante diferentes tiempos. Para mantener constante el pH del medio se trabajó en *buffer* TRIS (4 mM). Es importante destacar que el único compuesto que absorbe la radiación es el fotosensibilizador y que bajo estas condiciones de pH la base no se encuentra ionizada [Tajmir-Riahi, 1995 (a)].

Se registraron los espectros de absorbancia de las disoluciones irradiadas ([Figura 87](#)). Se puede ver cómo según va aumentando el tiempo de irradiación, disminuyen las intensidades de las bandas centradas en 340 y 270 nm aproximadamente. Además hay un incremento en la absorbancia a 300 y 400 nm. Estos cambios espectrales indican que está teniendo lugar un proceso fotoquímico.

Para el análisis de las disoluciones se empleó el HPLC descrito en el [Apartado 6.2](#). La [Figura 88](#) muestra los cromatogramas obtenidos a 280 nm de la disolución sin irradiar y después de 40 minutos de irradiación en ausencia de O₂. En el cromatograma de la disolución sin irradiar se observan dos picos correspondientes a Ptr (t_R = 8.3 minutos) y al oligonucleótido (t_R = 23.5 minutos). Después de 40 minutos de irradiación, ambos picos cromatográficos disminuyen.

Los cromatogramas registrados a 340 nm muestran numerosos productos con tiempos de retención cercanos al del oligonucleótido intacto ([Figura 89.a](#)). Estos productos poseen absorbancia en la región UV-A, con bandas centradas en 340 nm. Del pico cromatográfico más intenso se obtuvo el espectro de absorbancia ([Inset Figura 89.a](#)).

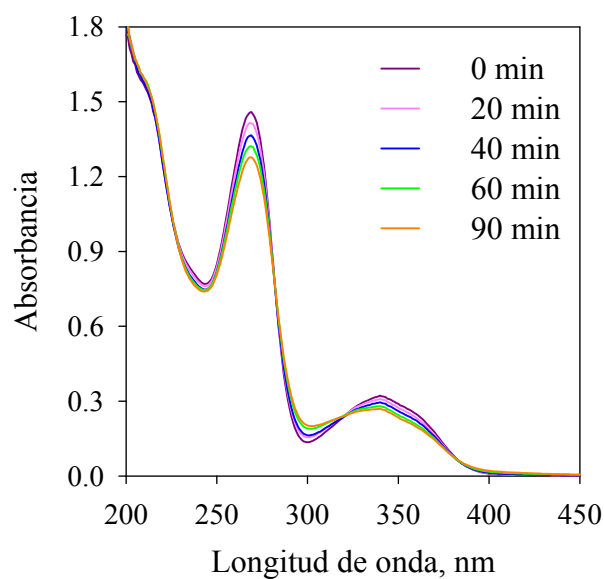


Figura 87. Evolución temporal de los espectros de absorbancia de una mezcla de Ptr y dT_5 irradiada durante diferentes tiempos en ausencia de O_2 . $[Ptr]_0 = 150 \mu M$, $[dT_5]_0 = 50 \mu M$, $pH = 5.5 \pm 0.1$.

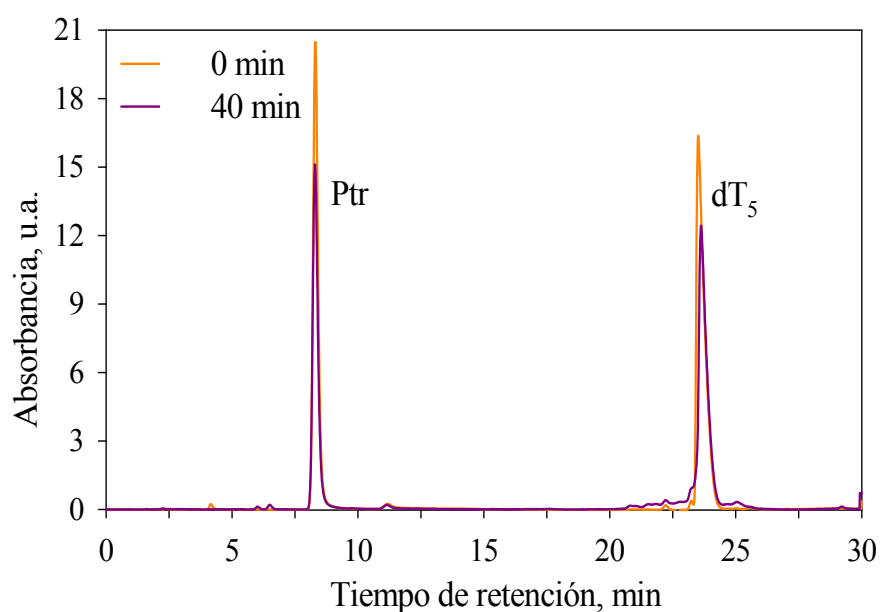


Figura 88. Análisis de HPLC-PDA a 280 nm de una disolución de Ptr y dT_5 antes (línea naranja) y después de 40 min de irradiación (línea morada) en ausencia de O_2 . $[Ptr]_0 = 150 \mu M$, $[dT_5]_0 = 50 \mu M$, $pH = 5.5 \pm 0.1$.

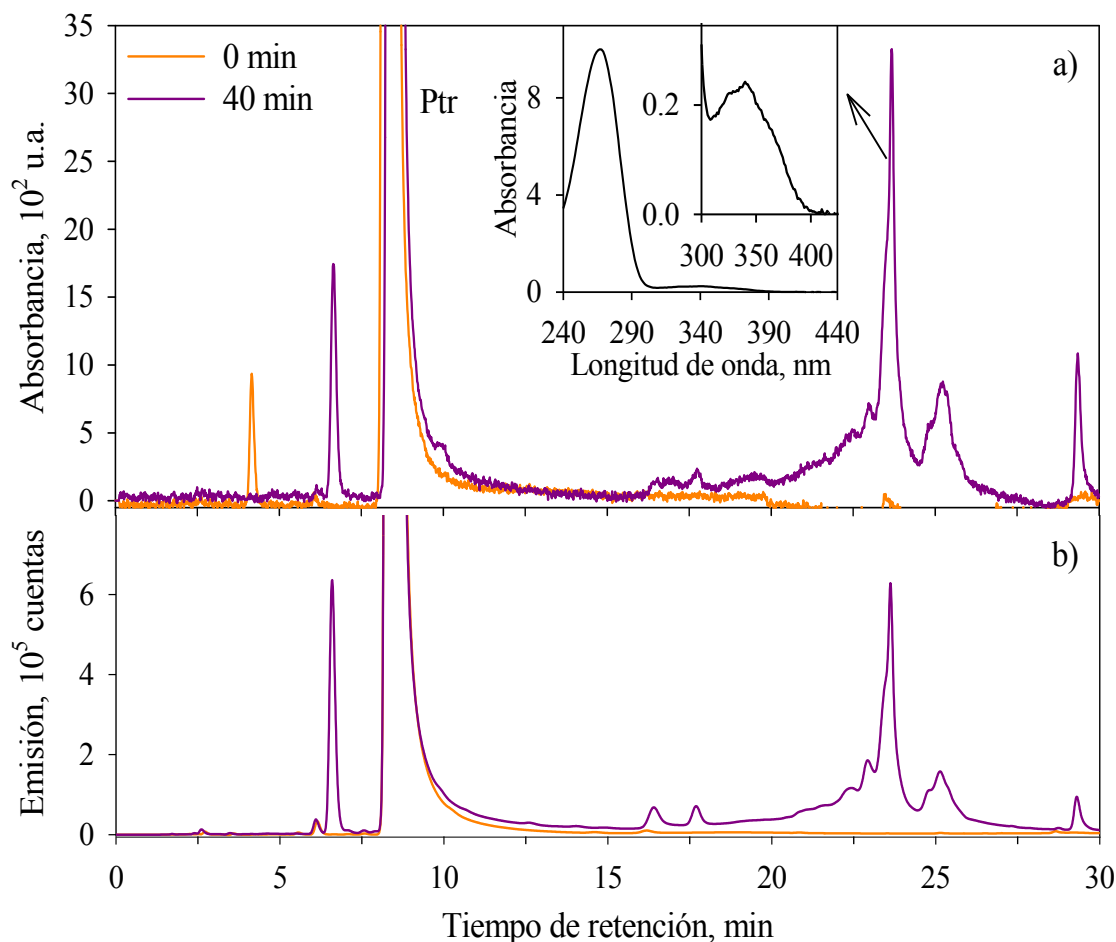


Figura 89. Análisis de HPLC de una disolución de Ptr y dT₅ antes (línea naranja) y después de 40 min de irradiación (línea morada) en ausencia de O₂. Cromatogramas obtenidos con el detector PDA a 340 nm (a) y con el de fluorescencia excitando a 350 nm y registrando la emisión a 450 nm (b). Inset: a) espectro de absorbancia de uno de los productos junto con una ampliación en el rango de 300 – 420 nm. $[Ptr]_0 = 150 \mu M$, $[dT_5]_0 = 50 \mu M$, $pH = 5.5 \pm 0.1$.

El análisis de HPLC con el detector de fluorescencia de las disoluciones irradiadas de Ptr y dT₅ muestra numerosos productos fluorescentes. Estos productos emiten a 450 nm cuando se les excita a 350 nm, lo que es compatible con las propiedades de fluorescencia de Ptr. Los picos más intensos aparecen a tiempos de retención cercanos al del oligonucleótido intacto y coinciden con los observados en el cromatograma a 340 nm. Se integró el pico cromatográfico de mayor intensidad, cuyo tiempo de retención es prácticamente el mismo que el del oligonucleótido intacto, y además se hizo una integración conjunta de todos los productos fluorescentes (Figura 90). En ambos casos, el área aumenta con el tiempo de irradiación, indicando que se están acumulando productos fluorescentes con absorbancia en el rango 300 – 400 nm. Estos resultados sugieren que el proceso fotoquímico conduce a la unión de Ptr al oligonucleótido, generando así

los productos fluorescentes. Finalmente, cabe mencionar que el pico cromatográfico que aparece a $t_R = 6.6$ minutos es un producto de fotodegradación de Ptr debido a la presencia de TRIS en el medio de reacción, observado también en los controles (Figura 89).

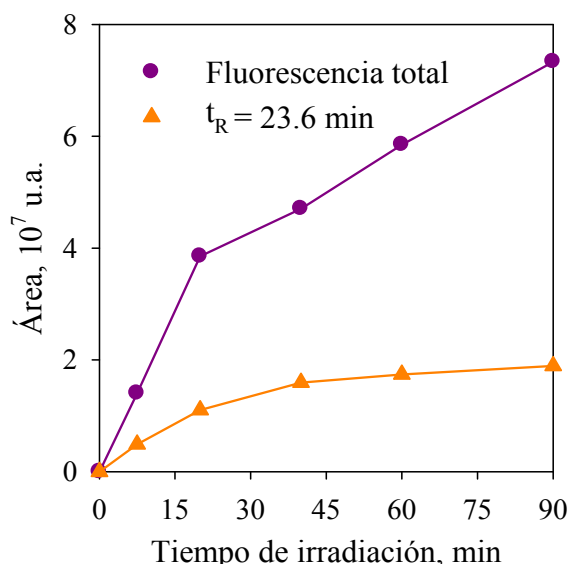


Figura 90. Evolución temporal del área de los picos correspondientes a los productos fluorescentes. $[Ptr]_0 = 150 \mu M$, $[dT_5]_0 = 50 \mu M$, $pH = 5.5 \pm 0.1$.

Se realizaron controles, en las mismas condiciones experimentales, irradiando disoluciones que contienen sólo Ptr o sólo oligonucleótido. La Figura 91 representa el consumo de Ptr en presencia y en ausencia de dT_5 para diferentes tiempos de irradiación. Se puede apreciar que la velocidad de consumo de Ptr en presencia del oligonucleótido de Thy fue mayor que la observada en el control. Esto quiere decir que cuando Ptr está en presencia de dT_5 se consume por la reacción fotoquímica que tiene lugar con el sustrato y no sólo por su propia fotoquímica. Es importante mencionar que el consumo de Ptr observado en ausencia de dT_5 no se debe exclusivamente a su fotoquímica, sino también a la presencia de TRIS en el medio de reacción. Cuando se irradia Ptr en condiciones anaeróbicas y en presencia de un buen donador de electrones, como es el caso del TRIS, puede reducirse y generar los correspondientes dihidroderivados [Dántola, 2010]. Cuando se irradió la disolución de oligonucleótido a 350 nm en ausencia de Ptr, no se observaron cambios espectrales y el análisis de HPLC reveló que no hay consumo del sustrato (Figura 92). Esto demuestra que los cambios químicos sufridos por el oligonucleótido cuando se irradia en presencia de Ptr no son generados de forma directa, sino por una reacción fotosensibilizada.

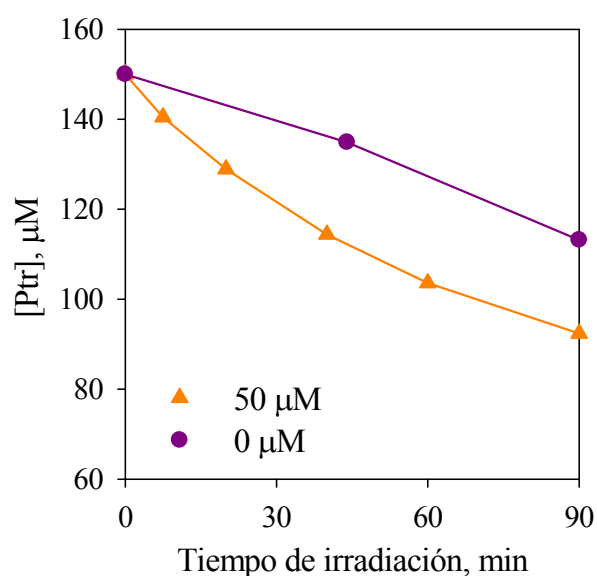


Figura 91. Evolución de la concentración de Ptr en función del tiempo de irradiación en condiciones anaeróbicas en presencia y en ausencia del sustrato. $[Ptr]_0 = 150 \mu M$, $[dT_5]_0 = 0 \mu M$ (círculo morado), $[dT_5]_0 = 50 \mu M$ (triángulo naranja), $pH = 5.5 \pm 0.1$.

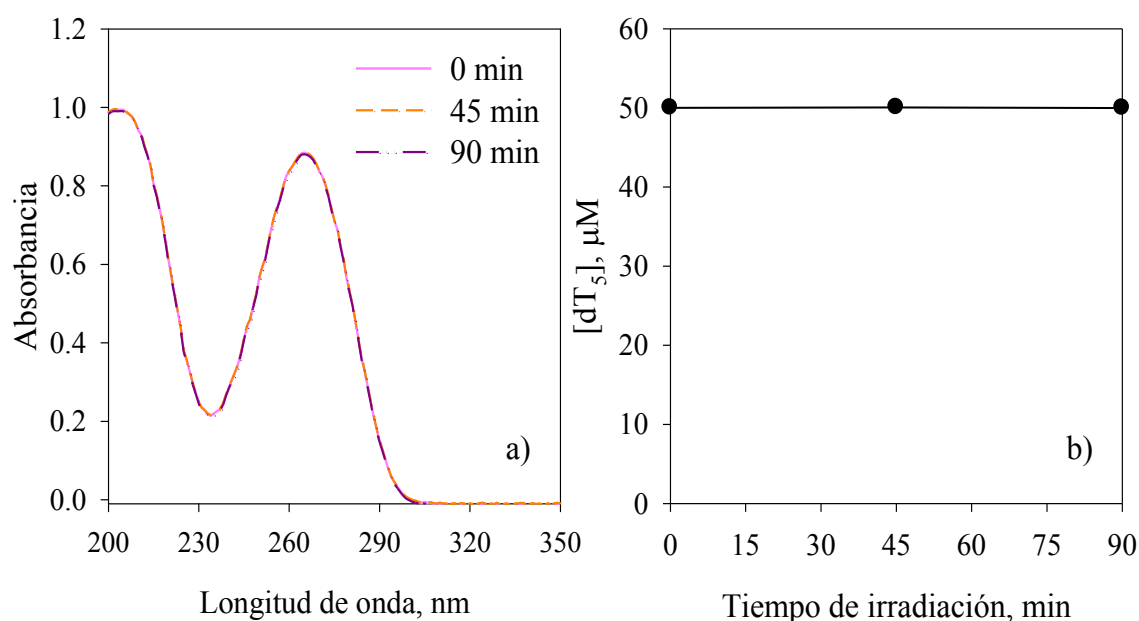


Figura 92. a) Espectro de una disolución de dT_5 irradiada durante diferentes tiempos en ausencia de O_2 . b) Evolución temporal de la concentración de dT_5 de una disolución irradiada durante diferentes tiempos en ausencia de O_2 . $[dT_5] = 50 \mu M$, $pH = 5.5 \pm 0.1$.

Se evaluó la posible interacción entre Ptr y el oligonucleótido registrando los espectros de emisión de Ptr en presencia y en ausencia de dT_5 (Figura 93). Los

resultados mostraron que el espectro de fluorescencia de Ptr no cambia en presencia del oligonucleótido en el rango de concentraciones utilizadas en este trabajo (0 – 50 μM), sugiriendo que no hay ningún tipo de interacción entre las moléculas. Tampoco se observaron cambios en el espectro de absorbancia de la Ptr cuando se encuentra en presencia de dT₅. Por todo esto, se puede asumir que el proceso fotoquímico descrito en el párrafo anterior es iniciado por una reacción controlada por difusión y que no existe una asociación de las moléculas previa a la excitación.

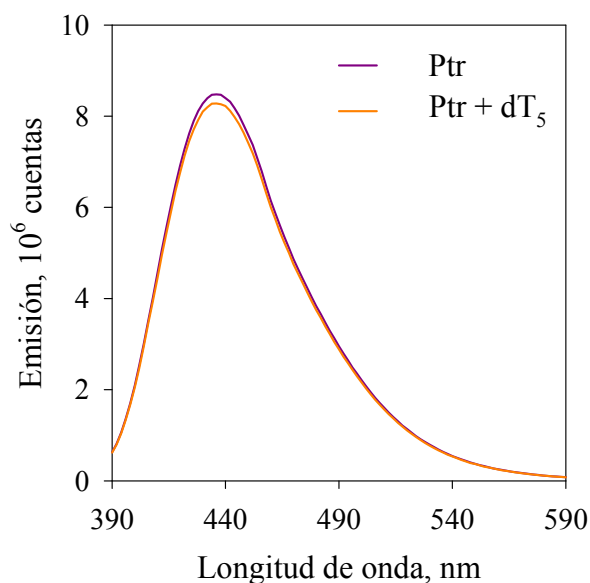


Figura 93. Espectro de emisión de Ptr en ausencia y en presencia de dT₅ ($\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$). $[\text{dT}_5] = 50 \mu\text{M}$, $\text{pH} = 5.5 \pm 0.1$.

Para confirmar que la irradiación de dT₅ en presencia de Ptr bajo condiciones anaeróbicas conduce a la unión covalente del fotosensibilizador al oligonucleótido, se realizó un análisis cualitativo de los fotoproductos con un UPLC acoplado a un sistema de espectrometría de masas (UPLC-Qtof-MS, [Apartado 6.3](#), Equipo 1). Las mezclas de dT₅ y Ptr se analizaron en modo negativo (ESI⁻) antes y después de la irradiación. La muestra sin irradiar presenta tres picos cromatográficos con tiempos de retención de 0.27, 0.8 y 7.6 minutos ([Figura 94](#)). El primero se debe a un residuo polimérico del equipo, como se mencionó en la sección de espectrometría de masas del [Capítulo 10](#), mientras que el espectro de masas del pico a $t_R = 0.8$ minutos muestra la señal correspondiente al ion molecular intacto de Ptr ($[\text{Ptr-H}]^-$). La fórmula molecular de dT₅ es $\text{C}_{50}\text{H}_{65}\text{N}_{10}\text{O}_{33}\text{P}_4$ y su peso molecular es 1458.27 Da. Este valor es un promedio de diferentes pesos debido, principalmente, a los isótopos naturales del carbono, aunque los isótopos del nitrógeno y del oxígeno también contribuyen. Así, el espectro de masas registrado para dT₅ (pico cromatográfico a $t_R = 7.6$ minutos) consiste en grupos de señales correspondientes a los iones monocargado ($[\text{dT}_5\text{-H}]^-$, m/z 1457.27), dicargado ($[\text{dT}_5\text{-2H}]^{2-}$, m/z 728.13) y tricargado ($[\text{dT}_5\text{-3H}]^{3-}$, m/z

485.09). El grupo de señales del ion dicargado es mucho más intenso que los correspondientes a los otros iones (Figura 95), por lo que el análisis se realizó con los iones dicargados (Figura 96.a). Se registraron los cromatogramas de la masa de dT₅ (ion dicargado) para los diferentes tiempos de irradiación. Se integró el pico cromatográfico ($t_R = 7.6$ minutos) y se representó el área obtenida en función del tiempo de irradiación (Inset Figura 96.a). El consumo del oligonucleótido es del 57 % aproximadamente, en 90 minutos de irradiación.

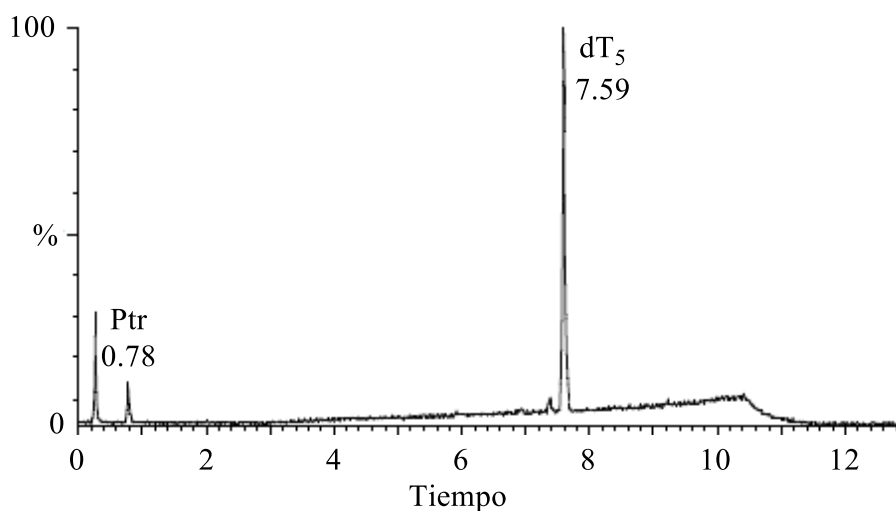


Figura 94. Cromatograma obtenido con el detector de masas de la mezcla de Ptr y dT₅ antes de la irradiación. $[Ptr]_0 = 150 \mu M$, $[dT_5]_0 = 50 \mu M$, $pH = 5.5 \pm 0.1$. Equipo 1.

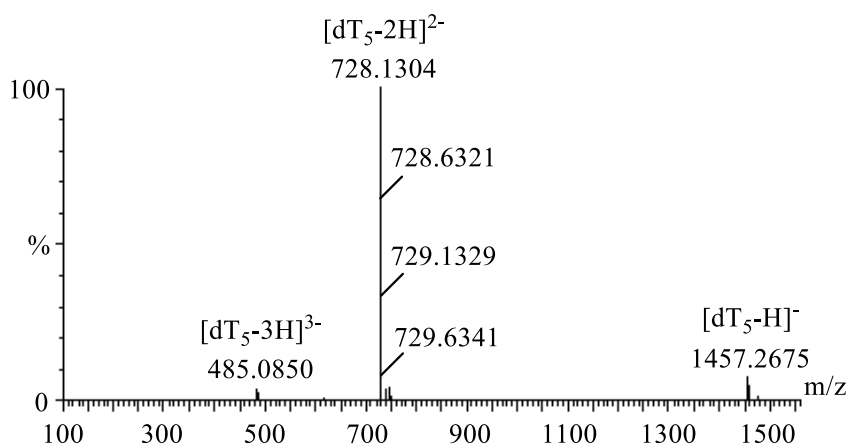


Figura 95. Espectro de masas ESI del pico cromatográfico a $t_R = 7.6$ min correspondiente a dT₅. Equipo 1.

En las disoluciones irradiadas se identificó el oligonucleótido con una Ptr unida covalentemente, cuya fórmula química y masa molecular son C₅₀H₆₆N₁₀O₃₃P₄ y 1459.00 g/mol, respectivamente. La Figura 96.b muestra el

espectro de masas de este producto (ion dicargado), con una señal m/z a 808.6463 ($[\text{Ptr}+\text{dT}_5-4\text{H}]^{2-}$). Se analizaron los cromatogramas para los diferentes tiempos de irradiación con el detector de masas a 808.60 Da. Alrededor de los 7.3 minutos de tiempo de retención aparece un pico que aumenta con el tiempo de irradiación (*Inset* Figura 96.b). Los datos muestran un rápido incremento del área del producto con el tiempo de irradiación hasta los 20 minutos, y a partir de los 40 minutos comienza a descender.

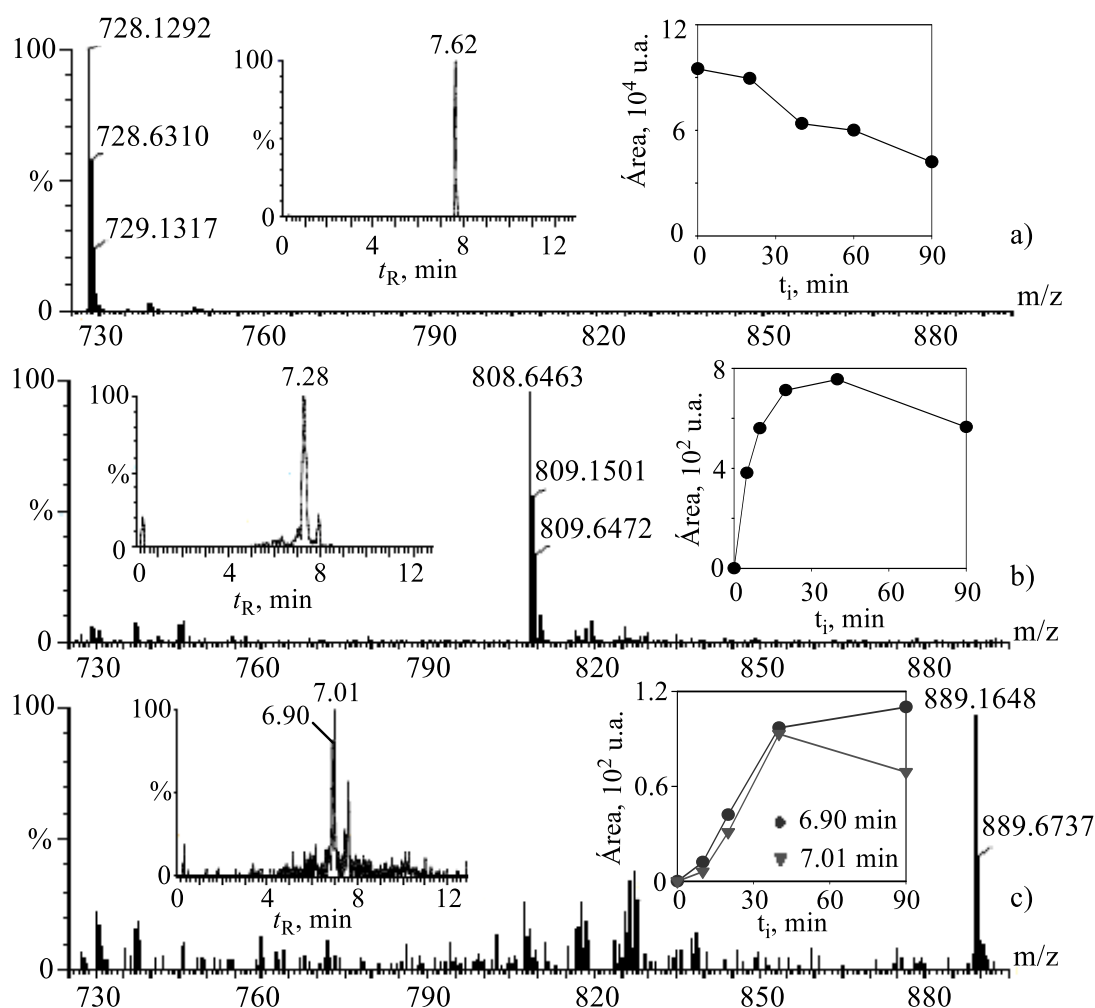


Figura 96. Análisis de espectrometría de masas de una disolución que contiene Ptr y dT_5 irradiada durante 40 min en ausencia de O_2 . Espectros de masas ESI de los iones dicargados de a) dT_5 ($[\text{dT}_5-2\text{H}]^{2-}$); b) producto a $t_R = 7.3$ min ($[\text{Ptr}+\text{dT}_5-4\text{H}]^{2-}$); c) producto a $t_R = 6.9$ min ($[2\text{Ptr}+\text{dT}_5-6\text{H}]^{2-}$). Insets: cromatogramas registrados con el detector de masas para las masas específicas de dichos iones y evolución temporal del área de los correspondientes picos cromatográficos. Equipo 1.

Se observó otro grupo de señales con m/z a 889.1648 (Figura 96.c), que se corresponde con el ion dicargado del oligonucleótido que ha incorporado dos moléculas de Ptr a su estructura ($[2\text{Ptr}+\text{dT}_5-6\text{H}]^{2-}$). Cuando se registra el cromatograma con el detector de masas seleccionando la masa de dicho ion, se

obtienen dos picos cromatográficos con tiempos de retención muy similares ($t_R = 6.9 - 7.0$ minutos, *Inset Figura 96.c*), sugiriendo que se forman al menos dos isómeros de este aducto. Se realizó una integración de estos picos a los diferentes tiempos de irradiación, y se representó el área obtenida en función del tiempo (*Inset Figura 96.c*). Estos isómeros presentan una velocidad de generación baja durante los primeros minutos, aumentando fuertemente a partir de los 10 minutos. Sin embargo, en la cinética del producto que aparece a los 7.3 minutos (*Inset Figura 96.b*), se puede apreciar que la velocidad de generación es extremadamente alta, es decir, a los 10 minutos de reacción se obtiene más del 50 % de la concentración máxima. Este resultado parece razonable si se tiene en cuenta que el oligonucleótido que contiene dos fotosensibilizadores se forma a partir del que se había modificado previamente por la unión de una Ptr, es decir, primero se da la unión de una Ptr a dT_5 y posteriormente se une la segunda Ptr sobre la misma cadena.

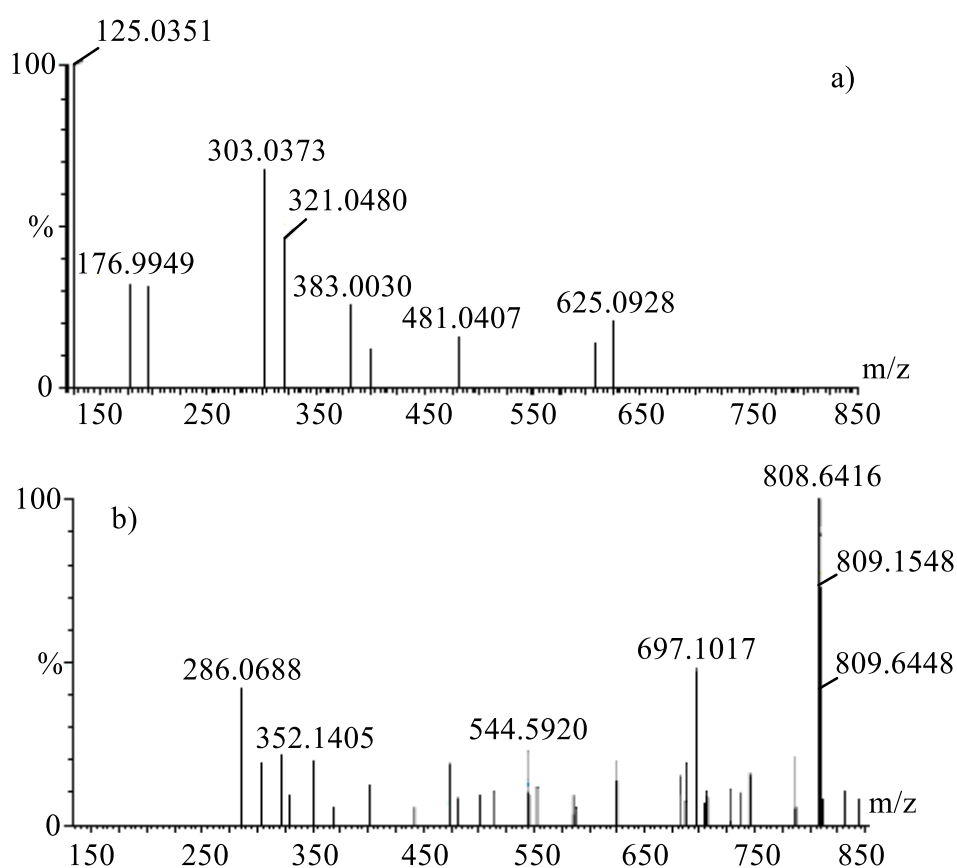


Figura 97. Espectro MS/MS registrado en modo ESI⁻ del a) ion dicargado del dT_5 ($[dT_5-2H]^{2-}$); b) ion dicargado del producto con un $t_R = 7.3$ min ($[Ptr+dT_5-4H]^{2-}$). Análisis de una mezcla de Ptr y dT_5 irradiada durante 40 min en ausencia de O_2 . Equipo 1.

Se registró el espectro MS/MS en modo ESI⁻ del producto que aparece a los 7.3 minutos ($[Ptr+dT_5-4H]^{2-}$) y se comparó con el espectro MS/MS del

oligonucleótido intacto ($[dT_5-2H]^2-$) (Figura 97). El espectro MS/MS del producto muestra una señal m/z a 286.0688, que no aparece en el espectro MS/MS del ion dicargado de dT_5 y que puede deberse al ion monocargado del fragmento $[Ptr+Thy-3H]^-$. Debido a que el error entre la masa encontrada (286.0688 Da) y la calculada a partir de la fórmula química ($C_{11}H_8N_7O_3$, 286.0688 Da) es de 0 ppm, dicha señal se puede asignar al fragmento $[Ptr+Thy-3H]^-$. Este hecho evidencia que, al igual que ocurre con $dTMP$ y dT , después de la etapa de transferencia electrónica, los radicales en su forma iónica o neutra se combinan para generar un aducto en el que el resto pterínico se enlaza covalentemente al oligonucleótido.

12.2. FOTOSENSIBILIZACIÓN DE UN OLIGONUCLEÓTIPO DE TIMINA INDUCIDA POR PTERINA EN PRESENCIA DE O_2

Se expusieron a radiación UV-A (Sistema de irradiación I) disoluciones de Ptr y dT_5 equilibradas en aire y se registraron los espectros de absorbancia (Figura 98). Los cambios espectrales obtenidos en presencia de O_2 son mucho más marcados que los que se observaron para las muestras irradiadas en condiciones anaeróbicas, observándose una fuerte disminución de las intensidades de las bandas centradas a 270 y 340 nm aproximadamente.

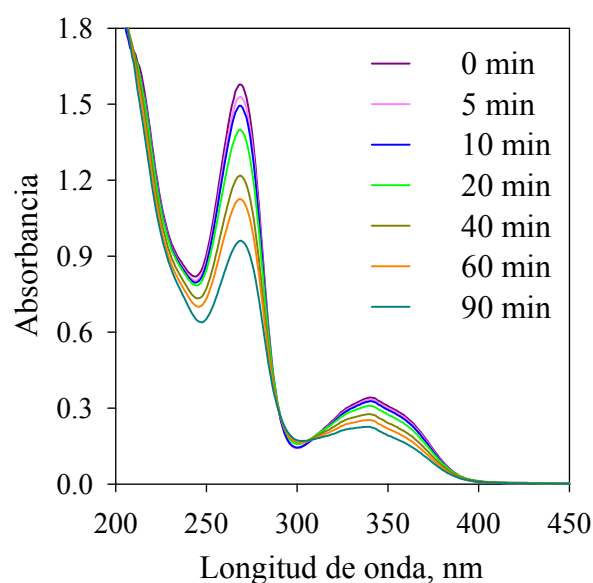


Figura 98. Evolución temporal de los espectros de absorbancia de una mezcla de Ptr y dT_5 irradiada durante diferentes tiempos en presencia de O_2 . $[Ptr]_0 = 150 \mu M$, $[dT_5]_0 = 50 \mu M$, $pH = 5.5 \pm 0.1$.

El análisis de HPLC con el detector PDA a 280 nm (Figura 99) mostró que los picos cromatográficos correspondientes a Ptr y dT_5 disminuyen notablemente con el tiempo de irradiación. La velocidad de consumo de Ptr en presencia y en

ausencia de dT_5 es la misma (Figura 100). Por lo tanto, el consumo de Ptr en presencia de O_2 se atribuye a su propia degradación fotoquímica y no a la generación de un aducto con dT_5 .

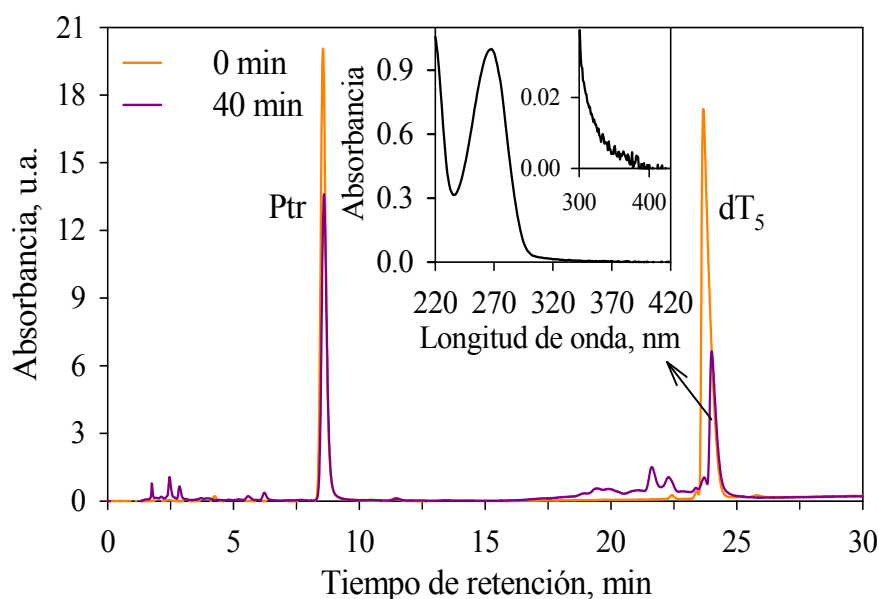


Figura 99. Análisis de HPLC-PDA a 280 nm de disoluciones de Ptr y dT_5 equilibradas en aire antes (línea naranja) y después de 40 min de irradiación (línea morada). Insets: espectro de absorbancia de uno de los productos junto con una ampliación de la escala en el rango de 300 – 420 nm. $[Ptr]_0 = 150 \mu M$, $[dT_5]_0 = 50 \mu M$, $pH = 5.5$.

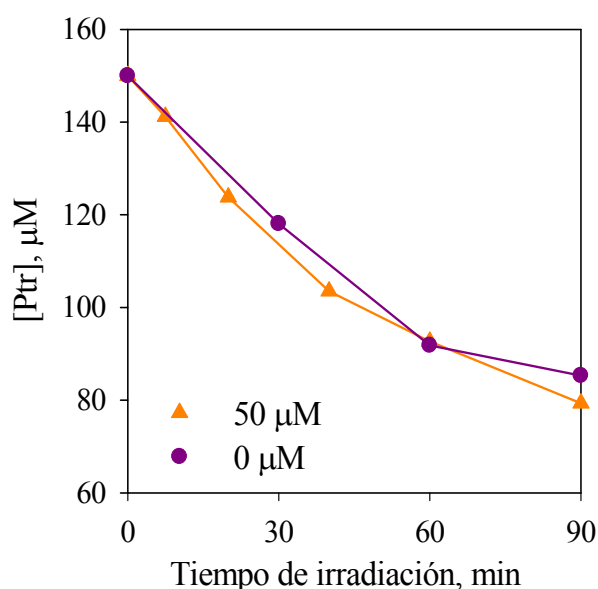


Figura 100. Evolución de la concentración de Ptr en función del tiempo de irradiación en presencia y en ausencia del sustrato. $[Ptr]_0 = 150 \mu M$, $[dT_5]_0 = 0 \mu M$ (círculo morado), $[dT_5]_0 = 50 \mu M$ (triángulo naranja), $pH = 5.5 \pm 0.1$.

En el cromatograma a 280 nm de las muestras irradiadas aparecen nuevos picos cromatográficos con tiempos de retención similares al del oligonucleótido, revelando la formación de diferentes fotoproductos. Sin embargo, en los mismos cromatogramas registrados a 340 nm y con el detector de fluorescencia ($\lambda_{\text{ex}} = 350$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 450$ nm) no se observó ningún pico correspondiente a productos (Figura 101). Adicionalmente, los espectros de absorbancia de los productos observados en el cromatograma a 280 nm no presentan ninguna banda centrada a 340 nm (Inset Figura 99), como ocurría con los productos generados en ausencia de O_2 .

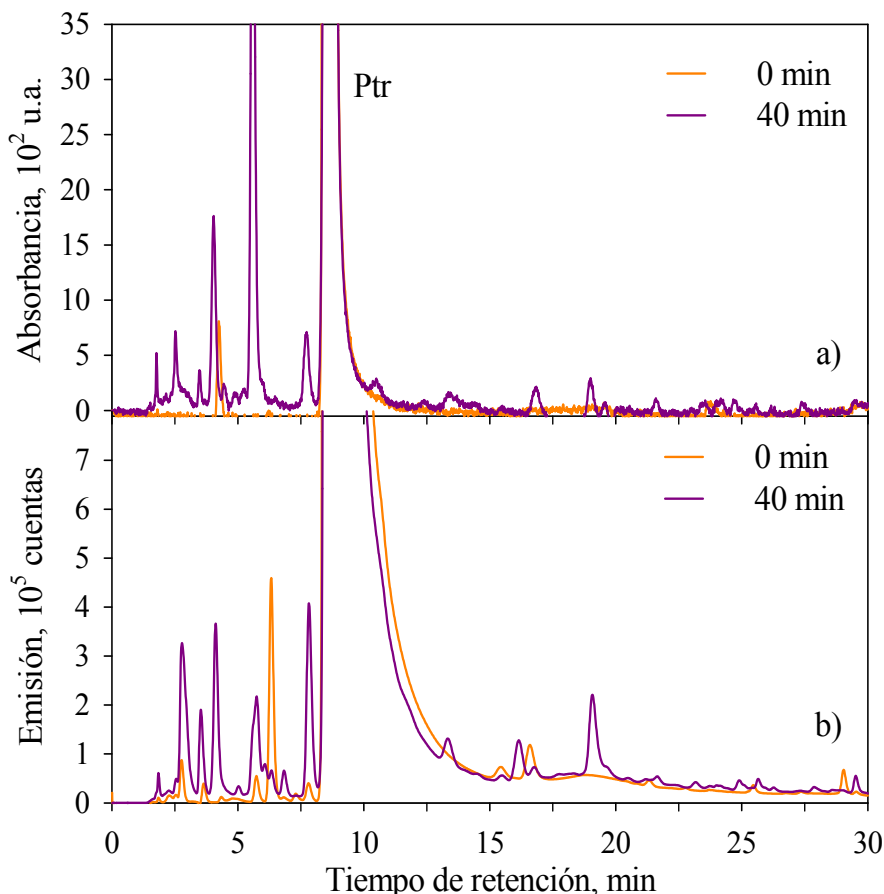


Figura 101. Análisis de HPLC de disoluciones de Ptr y dT₅ equilibradas en aire antes (línea naranja) y después de 40 min de irradiación (línea morada). a) Cromatograma obtenido a 340 nm; b) Cromatograma obtenido con el detector de fluorescencia excitando a 350 nm y registrando la emisión a 450 nm. $[\text{Ptr}]_0 = 150 \mu\text{M}$, $[\text{dT}_5]_0 = 50 \mu\text{M}$, $\text{pH} = 5.5 \pm 0.1$.

Este estudio sugiere que el proceso fotoquímico en presencia de O_2 no conduce a la unión de Ptr a la cadena del oligonucleótido, coincidiendo con el comportamiento observado previamente para el nucleótido y nucleósido en forma libre.

Por espectrometría de masas (Equipo 1) se realizó una búsqueda de los productos con uno o dos residuos de Ptr unidos al oligonucleótido ($[\text{Ptr}+\text{dT}_5-4\text{H}]^{2-}$ y $[2\text{Ptr}+\text{dT}_5-6\text{H}]^{2-}$). No se encontró ninguno de los aductos,

confirmando que en presencia de O_2 , no se da la unión de Ptr a la cadena de dT_5 durante la reacción fotosensibilizada.

12.3. PROPIEDADES DEL ADUCTO PTERINA–TIMINA GENERADO EN EL OLIGONUCLEÓTIDO DE TIMINA

El aducto generado en dT_5 no puede aislarse de forma pura con el HPLC, dado que su tiempo de retención coincide con el del oligonucleótido. Sin embargo, se aisló una fracción que contenía al oligonucleótido intacto y modificado.

Se registraron los espectros de emisión ($\lambda_{ex}=350$ nm) y de excitación ($\lambda_{em}=440$ nm) de la fracción aislada, mostrando características espectrales muy similares a Ptr (Figura 102).

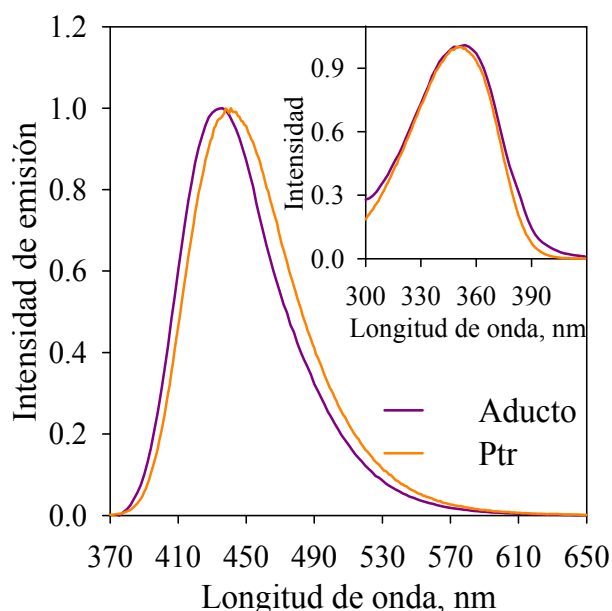


Figura 102. Espectro de emisión ($\lambda_{ex}=350$ nm) del aducto Ptr- dT_5 (línea morada) generado en la irradiación de dT_5 en presencia de Ptr durante 60 min bajo condiciones anaeróbicas y de Ptr (línea naranja). El producto fue aislado del HPLC. Inset: espectros de excitación obtenidos fijando la longitud de onda de emisión a 440 nm. $[Ptr]_0 = 150 \mu M$, $[dT_5]_0 = 50 \mu M$, $pH = 5.5 \pm 0.1$.

Se registraron los espectros de emisión a diferentes pH de una fracción del aducto recolectada (Figura 103) con el fin de determinar el pK_a del producto. El pH inicial fue de 6.5 ± 0.1 . En el proceso de acidificación la intensidad de los espectros va disminuyendo progresivamente, mientras que durante la alcalinización la intensidad de emisión va aumentando y además, se produce un desplazamiento del máximo hacia longitudes de onda mayores. Se integraron

todos los espectros de emisión y se representó el área en función del pH para obtener la curva de titulación. (Figura 104).

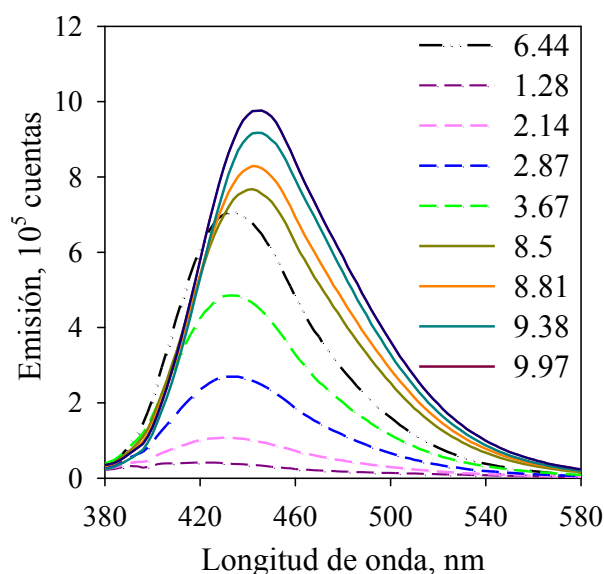


Figura 103. Espectro de emisión ($\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$) a diferentes pH del producto generado en la irradiación de dT_5 en presencia de Ptr durante 60 min bajo condiciones anaeróbicas. El producto fue aislado del HPLC.

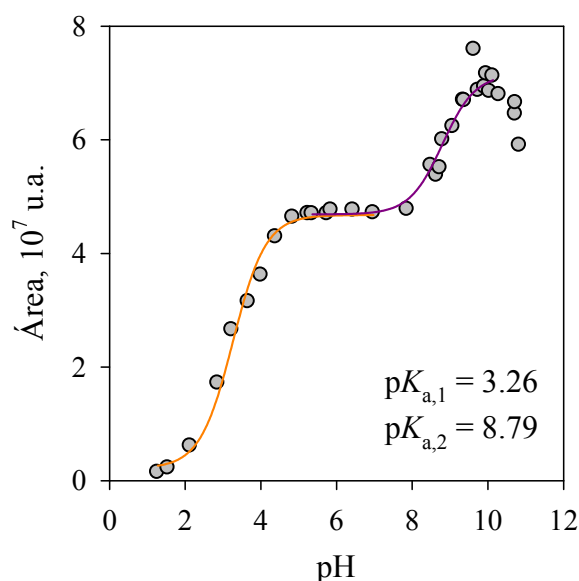


Figura 104. Curva de valoración de pH del aducto Ptr-dT_5 aislado del HPLC representando el área de los espectros de emisión en función del pH.

Puede observarse que a partir de pH 10.0 se produce una disminución de la intensidad de emisión, correspondiente a la característica desactivación del estado excitado singlete de Ptr por los iones hidroxilo del medio a través de un proceso dinámico [Thomas, 2002 (b)]. La curva muestra dos saltos, indicando que el producto presenta dos equilibrios de pH. Se calculó el valor del pK_a mediante un ajuste con la Ecuación 27, en los rangos de pH 1 – 6.5 y 6.5 – 9.5. Los valores

obtenidos fueron $pK_{a,1} = 3.12 \pm 0.13$ y $pK_{a,2} = 8.73 \pm 0.04$, que son ligeramente superiores a los de Ptr en disolución ($pK_{a,1} < 2$ y $pK_{a,2} \approx 8$) [Thomas, 2000; Albert, 1953; Monópoli, 2000; Thomas, 1996].

En experimentos resueltos en el tiempo, la muestra se excitó a 341 nm y se registró la señal del decaimiento de fluorescencia a 450 nm (Figura 105). El decaimiento de la emisión es biexponencial, con una componente principal de tiempo largo (F_1) y una componente menor de tiempo corto (F_2), a diferencia de lo observado con el aducto Ptr-dT. Del ajuste biexponencial de la curva se obtuvieron los tiempos de vida $\tau_{F1} = 6.4 \pm 0.4$ ns y $\tau_{F2} = 2.2 \pm 0.4$ ns con sus correspondientes factores pre-exponenciales $B_1 = 0.04$ y $B_2 = 0.03$. El valor del tiempo de vida de fluorescencia de la componente principal es del mismo orden que el reportado para Ptr libre en disolución acuosa (7.6 ± 0.4 ns) [Lorente, 2006]. Para obtener el espectro de emisión y la contribución de cada componente se registró un espectro de emisión con resolución temporal (TRES), excitando la muestra a 341 nm y registrando los decaimientos entre 370 y 550 nm. La variación de los factores pre-exponenciales de los ajustes de los decaimientos originó el espectro de emisión asociado a cada componente (Figura 106). Ambos espectros presentan características similares al de Ptr, con unos máximos centrados en 438 y 434 nm para F_1 y F_2 respectivamente. La contribución de cada componente se calculó multiplicando el área de cada espectro por el τ_F correspondiente, obteniendo unos valores de 77.8 y 22.2 % para F_1 y F_2 respectivamente. El hecho de que aparezcan dos componentes puede deberse a que haya más de una estructura química del producto, ya sea porque el fotosensibilizador se une sobre diferentes Thy o bien, porque se generan aductos con diferente estructura.

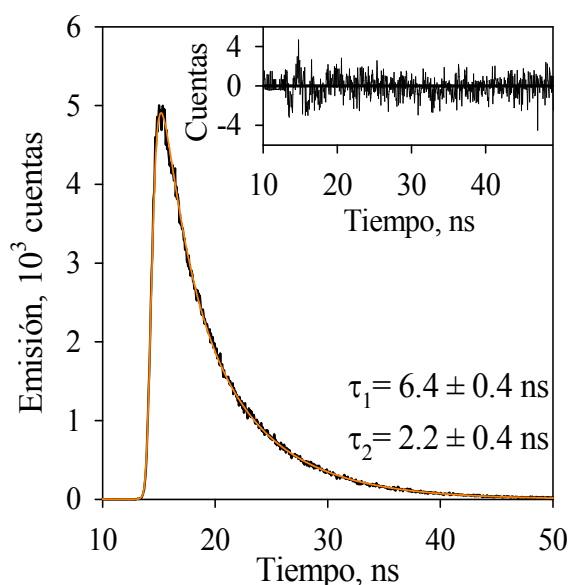


Figura 105. Decaimiento de la emisión de fluorescencia registrada a 450 nm ($\lambda_{ex} = 341$ nm) del aducto generado en la irradiación de dT₅ en presencia de Ptr durante 60 min bajo condiciones anaeróbicas. El producto fue aislado del HPLC. Inset: análisis de los residuos. $[Ptr]_0 = 150 \mu M$, $[dT_5]_0 = 50 \mu M$, $pH = 5.5 \pm 0.1$.

Los resultados presentados en este apartado muestran que el fotoproducto formado es fluorescente y sus propiedades de emisión son similares a las de Ptr. Este hecho es importante porque significa que Ptr mantiene sus propiedades fluorescentes, no sólo cuando se une covalentemente a dTMP o a dT, sino también cuando se enlaza a una cadena de nucleótidos.

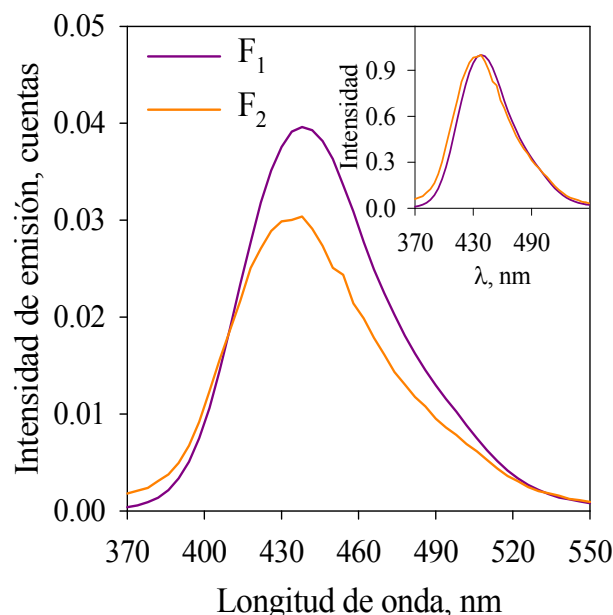


Figura 106. Espectros de emisión resueltos en el tiempo del aducto Ptr–Thy generado en el dT₅, siendo F1 y F2 las componentes de tiempo largo y corto respectivamente. Inset: espectros normalizados. [Ptr]₀ = 150 μ M, [dT₅]₀ = 50 μ M, pH = 5.5 \pm 0.1.

12.4. GENERACIÓN DE ADUCTOS FLUORESCENTES EN OTROS OLIGONUCLEÓTIDOS

Se evaluó el proceso de formación de aductos en otros oligonucleótidos. Se eligieron cadenas de cinco Cyt (dC₅), de cinco Gua (dG₅) y de cadena mixta conteniendo Thy y Gua. Estos últimos presentaban dos secuencias diferentes para ver si se observaba alguna diferencia debido a la posición de Gua. Las secuencias empleadas fueron 5'-d(TTGTT)-3' (en el texto TTGTT) y 5'-d(GTTTT)-3' (en el texto GTTTT), es decir, en una de ellas Gua ocupa la posición central y en la otra se encuentra en uno de los extremos de la cadena. Se ha reportado que Gua es la base con menor potencial de oxidación y por lo tanto, es la que se oxida con mayor facilidad [Ravanat, 2001; Steenken, 1989; Steenken, 1997]. El estudio con estas secuencias mixtas pretende comprobar si Gua evita la generación del aducto Ptr–Thy debido al efecto de la transferencia de huecos [Giese, 2000; Schuster, 2000; Wan, 2000].

12.4.1. Fotosensibilización de un oligonucleótido de citosina inducida por pterina

Se prepararon mezclas acuosas de Ptr y dC₅ a pH 5.5 y se irradiaron en ausencia de O₂ a 350 nm durante diferentes tiempos. Las disoluciones se analizaron por espectrometría de masas (UPLC-Qtof-MS, [Apartado 6.3](#), Equipo 2) antes y después de la irradiación. La fórmula química de dC₅ es C₄₅H₆₁N₁₅O₂₈P₄ y su peso molecular es de 1383.94 g/mol. La resolución del pico cromatográfico del oligonucleótido fue óptima para la especie dicargada, cuyo valor m/z es 690.63. Se siguió la evolución de la cadena dC₅ con el tiempo de irradiación ([Figura 107.a](#)), obteniendo un consumo de oligonucleótido del 23 % en 90 minutos, dentro del error experimental.

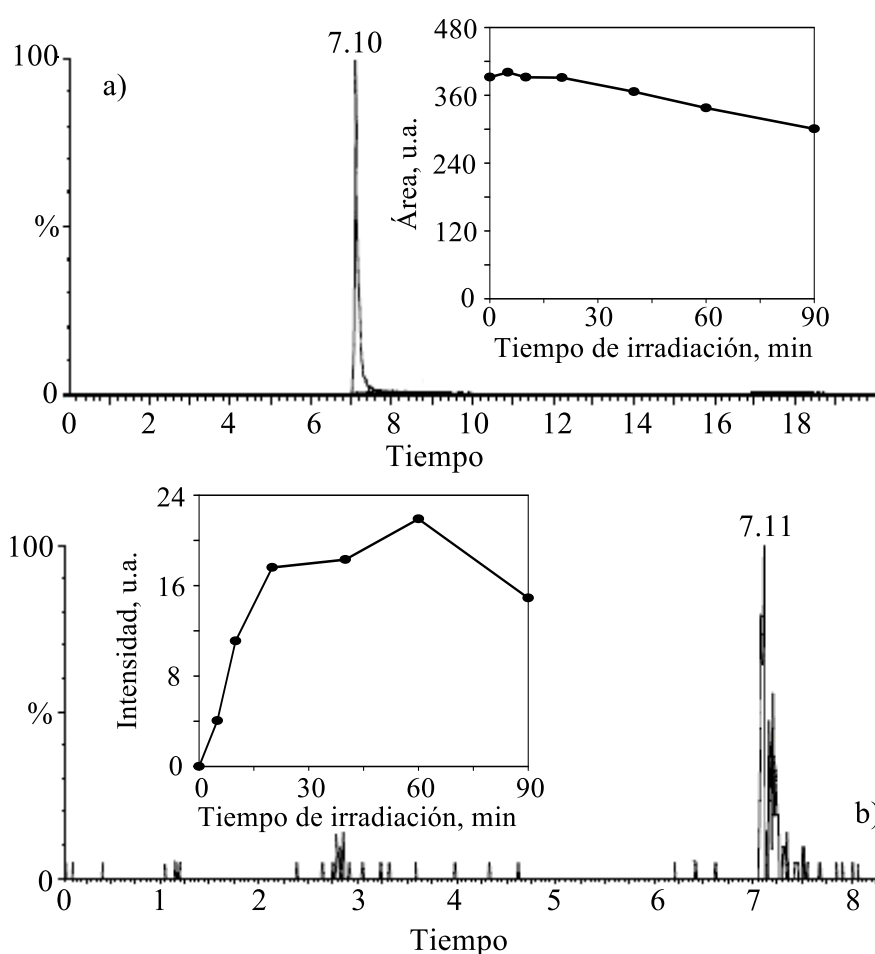


Figura 107. a) Cromatograma obtenido con el detector de masas fijo a 690.63 Da, correspondiente a dC₅; b) Cromatograma obtenido con el detector de masas fijo a 771.15 Da, correspondiente al fotoproducto $[Ptr+dC_5-4H]^2-$. Inset: evolución temporal de dC₅ (a) y del fotoproducto a $t_R = 7.11$ min (b). $[Ptr]_0 = 150 \mu M$, $[dC_5]_0 = 50 \mu M$, pH = 5.5 ± 0.1 . Equipo 2.

El producto de interés, es decir, dC₅ con una Ptr incorporada en su estructura, posee una fórmula química y masa molecular de C₅₁H₆₄N₂₀O₂₉P₄ y 1545.07 g/mol, respectivamente. La masa del ion dicargado de este compuesto presenta un valor de 771.15 Da. En los cromatogramas de las muestras irradiadas se observó un pico a un $t_R = 7.11$ minutos (Figura 107.b), que aumenta con el tiempo de irradiación (Inset Figura 107.b). El pico cromatográfico obtenido bajo estas condiciones presenta una intensidad muy baja, por lo que las muestras se secaron mediante liofilización, se resuspendieron en un volumen de disolvente menor y se analizaron nuevamente con el fin de obtener los espectros de masas y MS/MS del producto. El espectro de masas de la muestra concentrada contiene una señal m/z a 771.1477, correspondiente al ion dicargado del aducto [Ptr+dC₅-4H]²⁻ (Figura 108). El espectro MS/MS del ion m/z a 771.1477 (Figura 109) contiene una señal m/z a 271.0692, que puede deberse al ion monocargado del fragmento [Ptr+Cyt-3H]⁻. Dado que el error entre la masa encontrada (271.0692 Da) y la calculada a partir de la fórmula química (C₁₀H₇N₈O₂, 271.0697 Da) es de 1.8 ppm, se puede atribuir dicha señal al fragmento [Ptr+Cyt-3H]⁻.

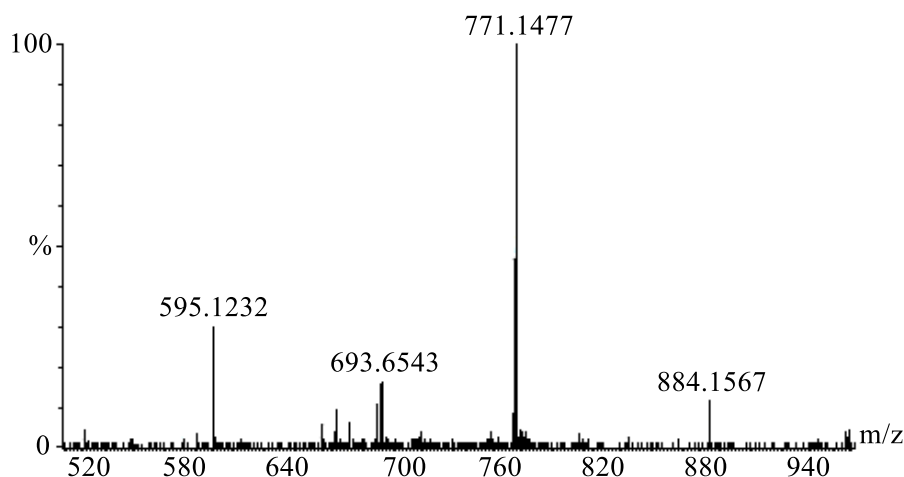


Figura 108. Espectro de masas ESI del pico cromatográfico a $t_R = 7.11$ min correspondiente al aducto [Ptr+dC₅-4H]²⁻. Equipo 2.

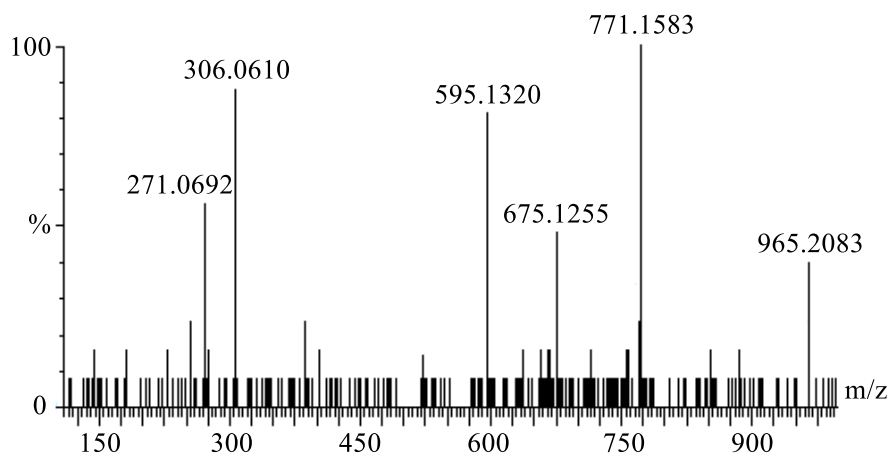


Figura 109. Espectro MS/MS ESI del pico cromatográfico a $t_R = 7.11$ min correspondiente al aducto [Ptr+dC₅-4H]²⁻. Equipo 2.

Estos resultados confirman que el aducto también se genera con el oligonucleótido de Cyt, pero al igual que ocurría con los nucleótidos libres, su producción es menos eficiente que con el de Thy. Concretamente, si comparamos el consumo de dT₅ (56 %) con el de dC₅ (23 %) para el mismo tiempo de irradiación, observamos que en el oligonucleótido de Cyt es menos de la mitad del obtenido con la cadena de Thy, dentro del error experimental.

12.4.2. Fotosensibilización de un oligonucleótido de guanina inducida por pterina

Se prepararon mezclas acuosas de Ptr y dG₅ a pH 5.5 y se irradiaron en ausencia de O₂ a 350 nm durante diferentes tiempos. Las disoluciones se analizaron por espectrometría de masas (UPLC-Qtof-MS, [Apartado 6.3](#), Equipo 2) antes y después de la irradiación. La cadena de dG₅ tiene un peso molecular de 1584.07 g/mol y la masa de su ion dicargado es 790.64 Da. En la [Figura 110](#) se representa el cromatograma registrado para dicha masa, cuyo área no disminuye con el tiempo de irradiación ([Inset Figura 110](#)).

La fórmula química y masa molecular del producto de interés, es decir, de dG₅ con una Ptr unida a su estructura, es C₅₆H₆₄N₃₀O₂₉P₄ y 1744.3406 g/mol, respectivamente. La masa del ion dicargado de este compuesto presenta un valor de 871.16 Da. En los cromatogramas de las muestras irradiadas no se observó ningún pico con dicha masa, lo cual era de esperar si se tienen en cuenta los resultados previos analizados en el [Capítulo 9](#). Sin embargo, el estudio de la fotosensibilización de este oligonucleótido es importante como control antes de trabajar con los oligonucleótidos de secuencia mixta.

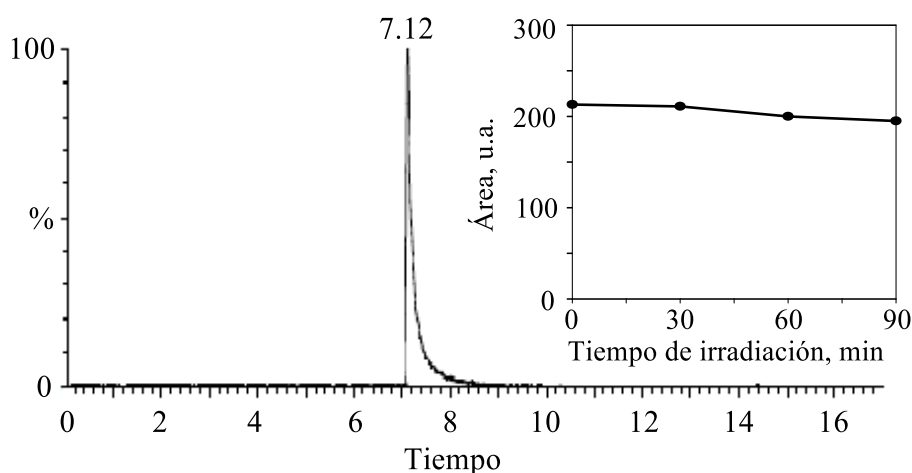


Figura 110. Cromatograma obtenido con el detector de masas fijo a 790.65 Da, correspondiente al pico cromatográfico de dG₅. Inset: Evolución temporal del dG₅ tras la irradiación en presencia de Ptr bajo condiciones anaeróbicas. [Ptr]₀ = 150 μM, [dG₅]₀ = 50 μM, pH = 5.5±0.1.

12.4.3. Fotosensibilización de oligonucleótidos de secuencia mixta inducida por pterina

Se prepararon disoluciones acuosas de Ptr y GTTTT o TTGTT, se irradiaron en ausencia de O_2 durante diferentes tiempos y se analizaron mediante espectrometría de masas (ESI, Equipo 2). La fórmula química y el peso molecular de estos oligonucleótidos es $C_{50}H_{65}N_{13}O_{32}P_4$ y 1484.01 g/mol, respectivamente. Los picos cromatográficos de las especies dicargadas presentaron la resolución óptima, con un valor m/z a 740.63. Se siguió la evolución con el tiempo de irradiación de las cadenas GTTTT (Inset Figura 111.a) y TTGTT (Inset Figura 112.a). Para ambas secuencias se obtuvo un consumo similar al de dT₅, dentro del error experimental.

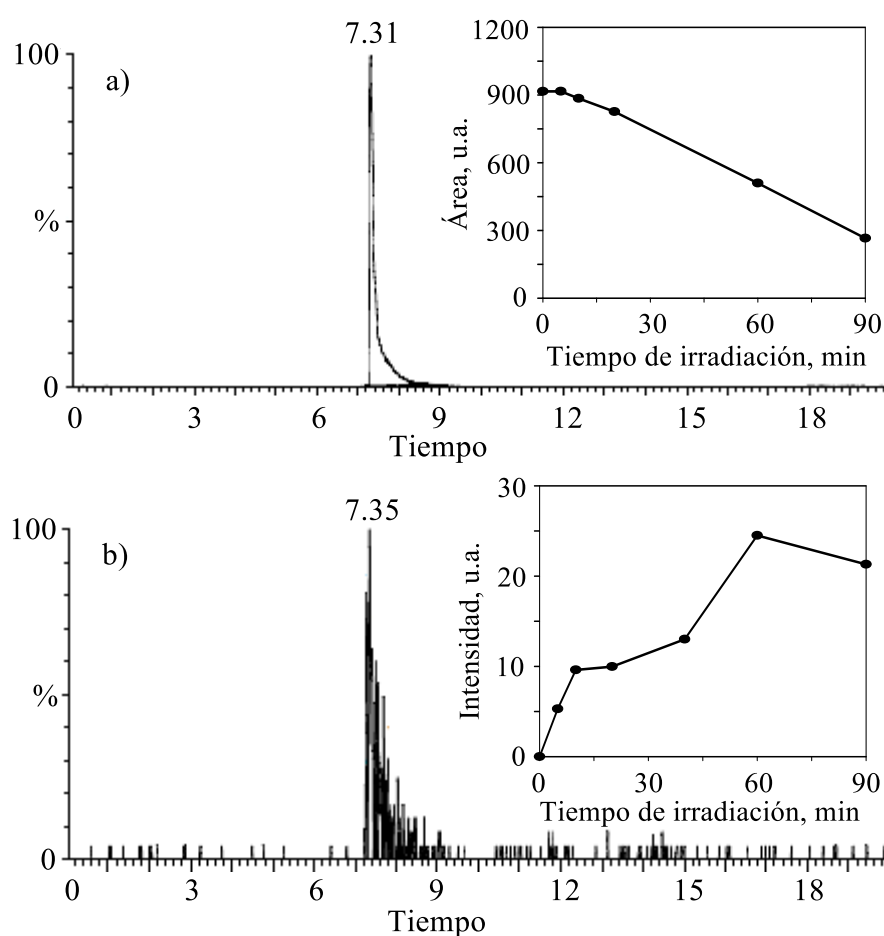


Figura 111. a) Cromatograma obtenido con el detector de masas fijo a 740.63 Da, correspondiente a GTTTT; b) Cromatograma obtenido con el detector de masas fijo a 821.15 Da, correspondiente al fotoproducto $[Ptr+GTTTT-4H]^2-$. Inset: evolución temporal de GTTTT (a) y del fotoproducto a $t_R = 7.35$ min (b). $[Ptr]_0 = 150 \mu M$, $[GTTTT]_0 = 50 \mu M$, $pH = 5.5 \pm 0.1$. Equipo 2.

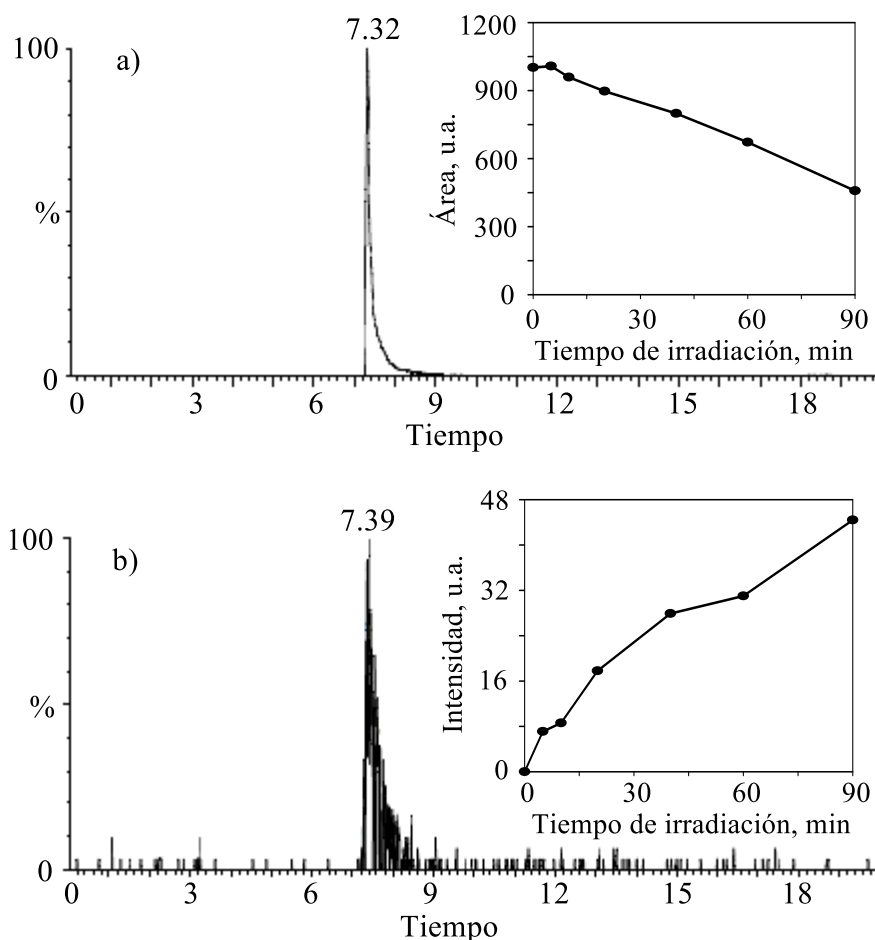


Figura 112. a) Cromatograma obtenido con el detector de masas fijo a 740.63 Da, correspondiente a TGTGT; b) Cromatograma obtenido con el detector de masas fijo a 821.15 Da, correspondiente al fotoproducto $[Ptr+TGTGT-4H]^{2-}$. Inset: evolución temporal de TGTGT (a) y del fotoproducto a $t_R = 7.39$ min (b). $[Ptr]_0 = 150 \mu M$, $[TGTGT]_0 = 50 \mu M$, $pH = 5.5 \pm 0.1$. Equipo 2.

La fórmula química de los productos de interés es $C_{56}H_{68}N_{18}O_{33}P_4$ y su peso molecular es de 1645.14 g/mol. La señal m/z del ion dicargado del aducto presenta un valor de 821.15. Los cromatogramas de las disoluciones irradiadas de Ptr y GTTTT (Figura 111.b) muestran un pico cromatográfico a $t_R = 7.35$ minutos que crece con el tiempo de irradiación (Inset Figura 111.b). Su espectro de masas presenta una señal m/z a 821.1439 (Figura 113), correspondiente al aducto $[Ptr+GTTTT-4H]^{2-}$.

Las disoluciones irradiadas de Ptr y TGTGT (Figura 112.b) también muestran un pico cromatográfico a $t_R = 7.39$ minutos que crece con el tiempo de irradiación (Inset Figura 112.b). Su espectro de masas ESI⁺ presenta un pico m/z a 821.1481 (Figura 114), confirmando la formación del aducto aducto Ptr-TGTGT.

Las intensidades de las señales de los productos generados con los oligonucleótidos mixtos son muy débiles y además, estos compuestos salen a unos

tiempos de retención muy próximos al de los reactivos correspondientes, por lo que no es posible obtener los espectros de masas puros. Por consiguiente, no se logró realizar una caracterización más detallada con los resultados obtenidos en este caso.

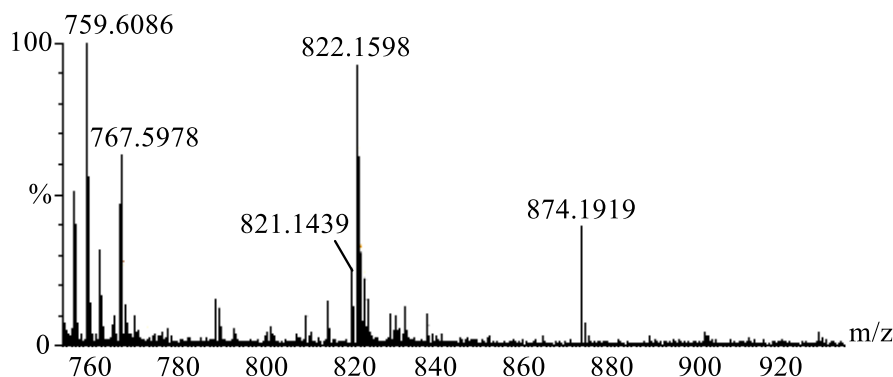


Figura 113. Espectro de masas ESI del pico cromatográfico a $t_R = 7.35$ min correspondiente al aducto $[Ptr+GTTTT-4H]^{2-}$. Equipo 2.

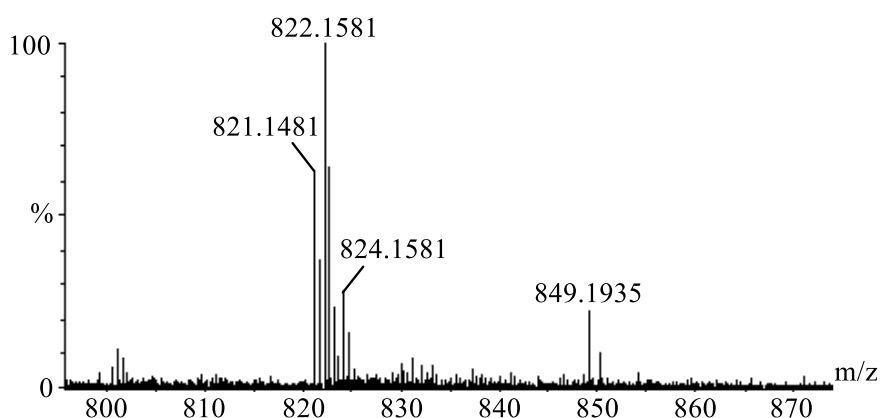


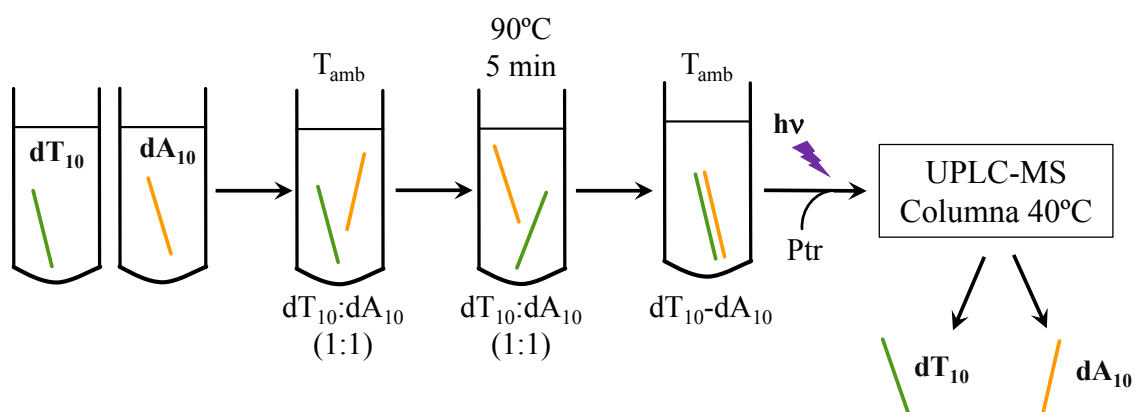
Figura 114. Espectro de masas ESI del pico cromatográfico a $t_R = 7.39$ min correspondiente al aducto $[Ptr+TTGTT-4H]^{2-}$. Equipo 2.

Sin embargo, se puede afirmar que el aducto se genera en estos oligonucleótidos, donde se ha sustituido una base de Thy por una de Gua. Está ampliamente reportado que Gua es la base con el menor potencial de oxidación y por lo tanto, en un mecanismo Tipo I, es la base más susceptible a ser oxidada [Ravanat, 2001; Steenken, 1989; Steenken, 1997]. Numerosos estudios afirman que cuando Gua forma parte de una cadena tiene lugar la transferencia de huecos [Giese, 2000; Schuster, 2000; Wan, 2000], lo que significa que cuando se generan radicales en otras bases, los mismos migran hacia Gua, evitando la formación de productos en el resto de las bases. Estos antecedentes sugieren que la formación del aducto Ptr–Thy podría estar impedida total o parcialmente cuando Gua forma

parte de la secuencia. Sin embargo, con el estudio presentado en este apartado se ha demostrado que la presencia de Gua en la cadena no evita la formación del aducto Ptr–Thy, y por lo tanto, no se puede descartar la formación de este producto en sistemas más complejos, como el ADN.

12.5. GENERACIÓN DE ADUCTOS FLUORESCENTES EN OLIGONUCLEÓTIDOS DE DOBLE HEBRA

La formación del aducto se investigó también en un oligonucleótido de cadena doble. En este caso se utilizaron cadenas de diez bases de Ade (dA₁₀) y Thy (dT₁₀). Para hibridar las hebras se prepararon disoluciones de la misma concentración y se mezclaron en una relación 1:1. La mezcla se calentó a baño maría a 90 °C durante cinco minutos y se dejó enfriar lentamente durante toda la noche [Dumat, 2013]. Una vez obtenida la doble hebra (dT₁₀-dA₁₀), se agregó Ptr a la disolución. La mezcla se irradió en ausencia de O₂ durante diferentes tiempos y se analizó mediante espectrometría de masas (Equipo 2, Esquema 10). Para trabajar a la misma concentración de Thy que en los experimentos con dT₅ (50 μM), se prepararon mezclas con una concentración de 25 μM de dT₁₀-dA₁₀.



Esquema 10. Procedimiento general de trabajo para la preparación y el análisis del oligonucleótido de hebra doble.

La fórmula química del oligonucleótido de cadena doble es C₂₀₀H₂₅₂N₇₀O₁₁₆P₁₈ y su peso molecular es de 6050.07 g/mol, el cual es demasiado elevado para la calibración disponible en el espectrómetro de masas. Por lo tanto, durante la separación de los componentes con el UPLC, la temperatura del horno se incrementó hasta 40 °C para que las hebras se separen al atravesar la columna y al detector lleguen compuestos con peso molecular más bajo (Esquema 10). Así, en el cromatograma de la muestra sin irradiar aparecen tres picos, correspondientes a Ptr, dT₁₀ y dA₁₀. Las fórmulas químicas de dT₁₀ y dA₁₀ son C₁₀₀H₁₃₁N₂₀O₆₈P₉ y C₁₀₀H₁₂₁N₅₀O₄₈P₉, y los pesos moleculares 2979.97 g/mol y 3070.10 g/mol, respectivamente. La resolución de los picos cromatográficos

correspondientes a dA_{10} y dT_{10} fue óptima para las especies tricargadas y tetracargadas, respectivamente. Se siguió la evolución temporal de las cadenas de dA_{10} y dT_{10} con el tiempo de irradiación (Figura 115). La concentración de dA_{10} permaneció invariable, mientras que la cadena de dT_{10} se consumió prácticamente al completo tras los 90 minutos de irradiación.

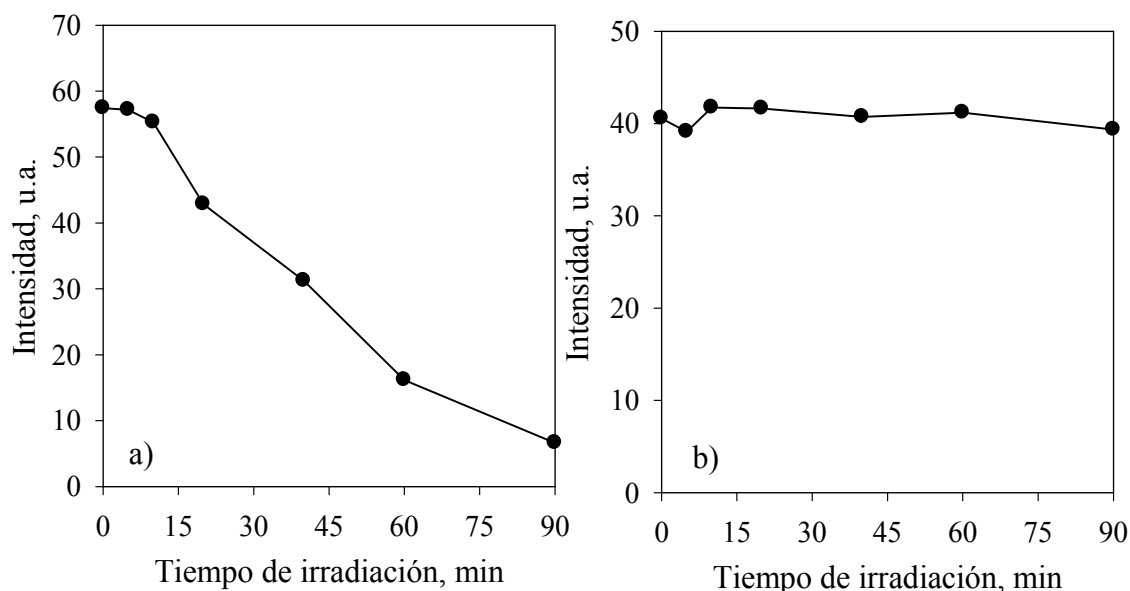


Figura 115. Evolución temporal de dT_{10} (a) y dA_{10} (b) obtenida al irradiar una disolución de Ptr y dT_{10} - dA_{10} en ausencia de O_2 . $[Ptr]_0 = 150 \mu M$, $[dT_{10}]_0 = 25 \mu M$, $[dA_{10}]_0 = 25 \mu M$, $pH = 5.5 \pm 0.1$. Equipo 2.

Se buscó el aducto sobre la cadena dT_{10} ($Ptr+dT_{10}-2H$), cuyo peso molecular es 3139.54 g/mol y la masa de su ion tetracargado es 784.12 Da ($[Ptr+dT_{10}-6H]^4$). En los cromatogramas de las muestras irradiadas se puede observar el pico correspondiente a dicha masa a un $t_R = 7.95$ minutos (Figura 116.a). La generación de este producto se da rápidamente durante los primeros 20 minutos de irradiación y, a continuación, su concentración disminuye (Figura 117.a). También se buscó el producto en el que se incorporan dos moléculas de Ptr a la cadena de Thy ($2Ptr+dT_{10}-4H$). Este compuesto presenta un peso molecular de 3302.21 g/mol y la masa de su ion tetracargado es 824.38 Da. Los cromatogramas de las disoluciones irradiadas presentan un pico cromatográfico a $t_R = 7.98$ minutos correspondiente a esta especie (Figura 116.b). La formación de este producto comienza después de 10 minutos de irradiación, obteniendo la máxima concentración a partir de los 40 minutos. Este comportamiento recuerda al observado con dT_5 (Figura 96). En ambos casos, la incorporación de una molécula de Ptr al oligonucleótido se da rápidamente durante los primeros tiempos de irradiación. A continuación, la concentración de este compuesto disminuye debido a que se incorpora otra molécula de fotosensibilizador a la estructura, dando lugar a la cadena con dos Ptr unidas.

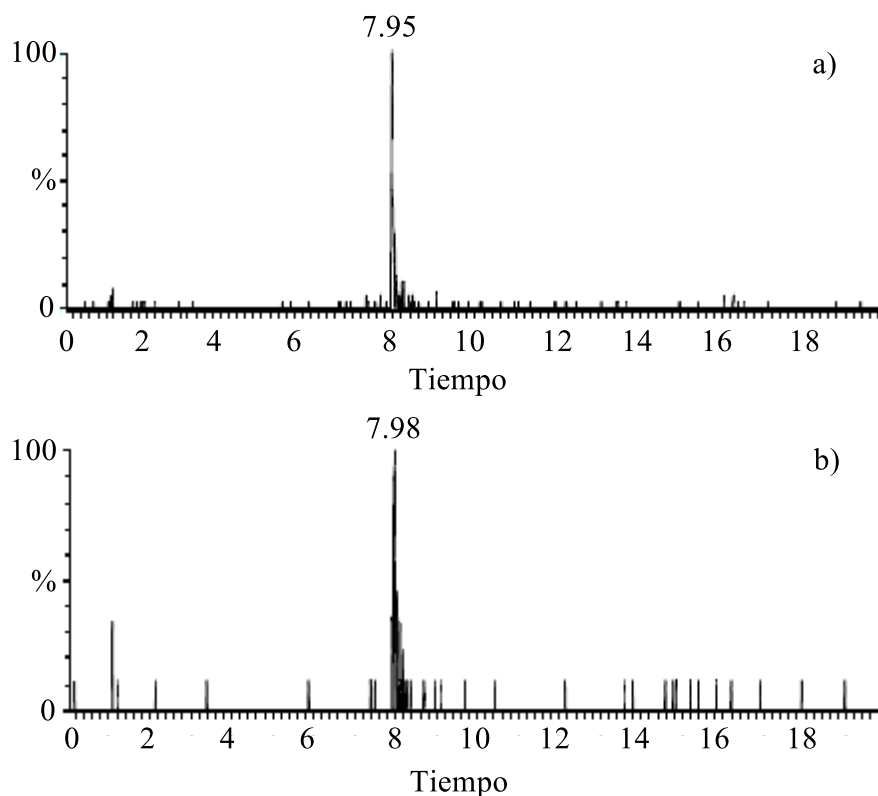


Figura 116. Cromatogramas registrados con el detector de masas fijo a (a) 784.12 Da y (b) 824.38 Da correspondientes a $[Ptr+dT_{10}-6H]^4-$ y $[2Ptr+dT_{10}-8H]^4-$, respectivamente, obtenidos de disoluciones de Ptr y $dT_{10}-dA_{10}$ irradiadas en ausencia de O_2 . $[Ptr]_0 = 150 \mu M$, $[dT_{10}]_0 = 25 \mu M$, $[dA_{10}]_0 = 25 \mu M$, $pH = 5.5 \pm 0.1$. Equipo 2.

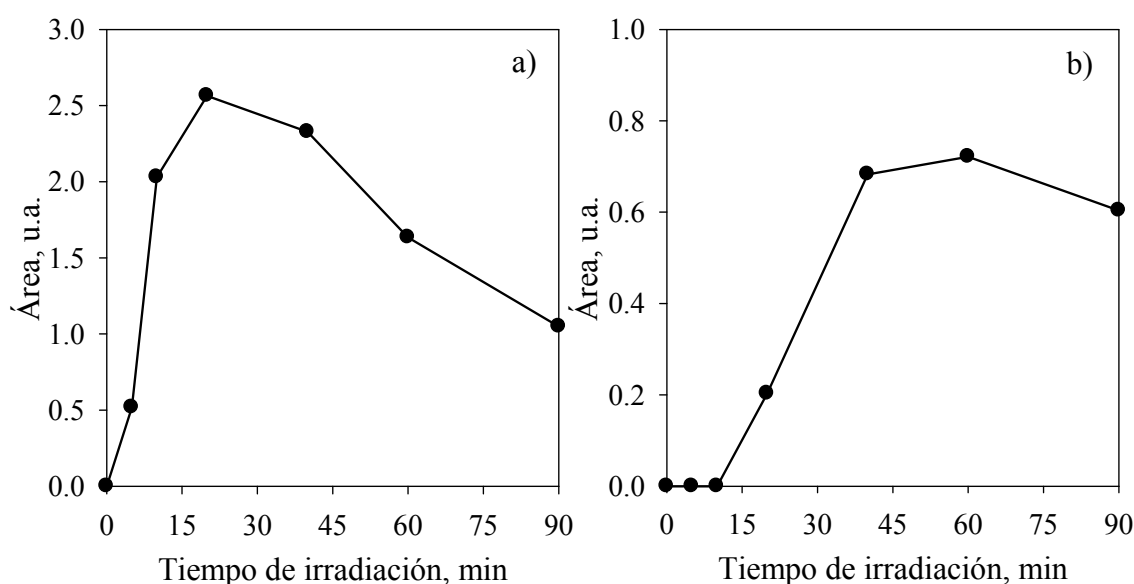


Figura 117. Evolución temporal de los fotoproductos $[Ptr+dT_{10}-6H]^4-$ (a) y $[2Ptr+dT_{10}-8H]^4-$ (b) obtenidos tras la irradiación en ausencia de O_2 de una disolución de Ptr y $dT_{10}-dA_{10}$. $[Ptr]_0 = 150 \mu M$, $[dT_{10}]_0 = 25 \mu M$, $[dA_{10}]_0 = 25 \mu M$, $pH = 5.5 \pm 0.1$. Equipo 2.

La formación de estos productos en un oligonucleótido de doble hebra es sumamente relevante debido a la mayor complejidad estructural de esta molécula. Cuando las hebras se encuentran apareadas, las bases quedan ubicadas en la parte interior de la estructura y, por lo tanto, el contacto con el fotosensibilizador podría verse obstaculizado. En el estudio descrito en este apartado se ha comprobado que este hecho no impide la formación de aductos Ptr–Thy.

13. GENERACIÓN FOTOQUÍMICA DE ADUCTOS FLUORESCENTES EN EL ADN

En este capítulo estudiaremos si Ptr forma aductos fluorescentes con ADN eucariota, comparando el proceso fotoquímico en diferentes condiciones experimentales. El estudio de la generación de estos productos en la macromolécula es de gran importancia biológica debido a las propiedades fluorescentes y fotosensibilizadoras del aducto.

13.1. FOTOSENSIBILIZACIÓN DE ADN EUCARIOTA EN AUSENCIA DE O₂

Se prepararon mezclas de Ptr y ADN en una relación 1:1, en disolución tampón de TRIS 10 mM a pH 6.5. El análisis de las disoluciones se realizó con HPLC, empleando una columna de exclusión molecular. Debido a la diferencia de tamaño entre ambas moléculas se logró una buena separación, con tiempos de retención de 5.0 y 12.9 minutos para el ADN y Ptr, respectivamente.

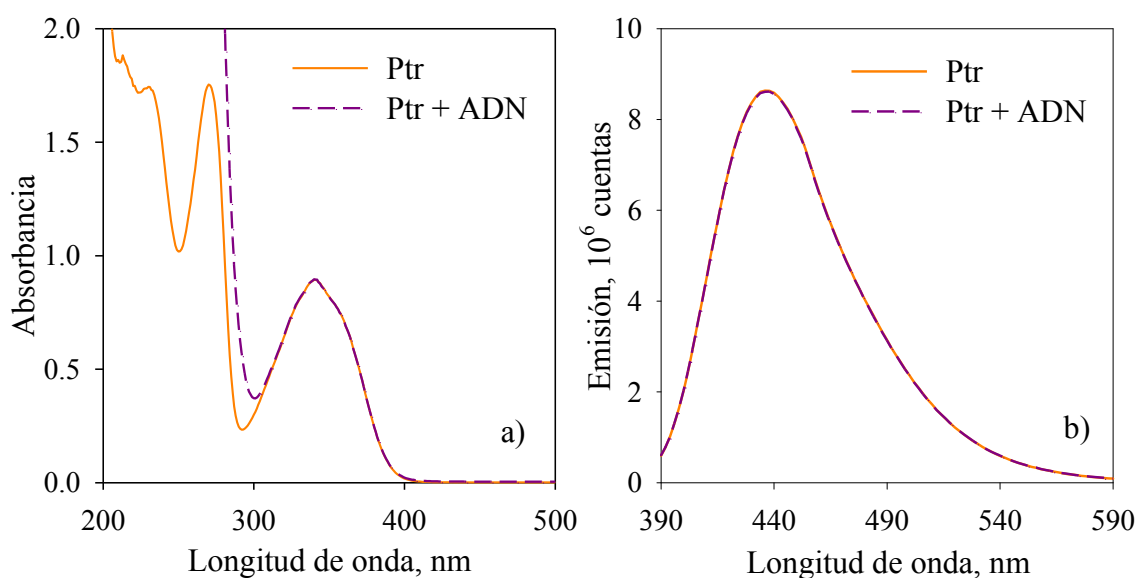


Figura 118. Espectros de absorbancia (a) y emisión (b) de Ptr en presencia (línea punteada morada) y en ausencia (línea continua naranja) de ADN. $[Ptr] = 150 \mu M$, $[ADN_{bp}] = 150 \mu M$, $pH = 6.5 \pm 0.1$.

Se realizaron controles para estudiar la interacción existente entre Ptr y ADN. Se prepararon dos disoluciones de Ptr de la misma concentración y se registraron los espectros de absorbancia y de emisión en presencia y en ausencia de ADN. Ninguno de ellos se modificó por la presencia de la biomacromolécula, revelando

que no existe interacción entre ambas moléculas en el estado basal ni desactivación de $^1\text{Ptr}^*$ (Figura 118). Una disolución acuosa de ambos compuestos se mantuvo en la oscuridad durante 6 horas a temperatura ambiente y se analizó mediante HPLC. No se observaron cambios cromatográficos (Figura 119.a), evidenciando, nuevamente, que no hay interacción entre ambas moléculas, al menos durante 6 horas. Consecuentemente, los experimentos de irradiación continua se realizaron dentro de esta ventana de tiempo.

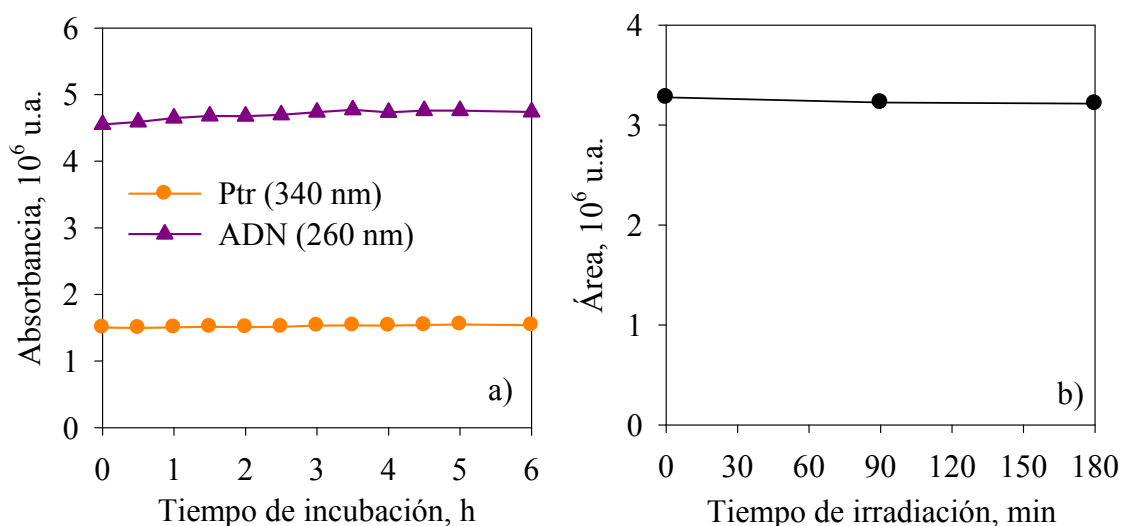


Figura 119. a) Evolución temporal del área de los picos cromatográficos de Ptr a 340 nm y del ADN a 260 nm de una mezcla de ambos compuestos mantenida en la oscuridad a temperatura ambiente. $[\text{Ptr}]_0 = 150 \mu\text{M}$, $[\text{ADN}_{bp}]_0 = 150 \mu\text{M}$, $\text{pH} = 6.5 \pm 0.1$; b) Evolución temporal de una disolución de ADN irradiada en ausencia de Ptr. $[\text{ADN}_{bp}]_0 = 150 \mu\text{M}$, $\text{pH} = 6.5 \pm 0.1$, $\lambda_{\text{análisis}} = 260 \text{ nm}$.

Además, se irradió una disolución de ADN en ausencia de Ptr en las mismas condiciones experimentales. La concentración de ADN permaneció invariable durante las tres horas de irradiación (Figura 119.b), descartando que la absorción directa de radiación por las nucleobases genere alteraciones químicas en la macromolécula.

Se irradiaron mezclas de ADN y Ptr durante diferentes tiempos en condiciones anaeróbicas. En los cromatogramas de las muestras irradiadas registrados a 260 nm (Figura 120.a) y 340 nm (Figura 120.b), se observó la aparición de un pico con un tiempo de retención cercano al del ADN ($t_R = 5.4$ minutos), que crece con el tiempo de irradiación. El espectro de absorción del pico cromatográfico a $t_R = 5.4$ minutos presenta absorbancia en la región UV-A (Inset Figura 120.a), con un máximo centrado aproximadamente a $374 \pm 1 \text{ nm}$. Este máximo es similar al de Ptr en medio alcalino, lo cual es lógico si tenemos en cuenta que en estos experimentos el pH del buffer es 7. Es importante mencionar que al tiempo de retención de la molécula de ADN intacta, no hay absorbancia en la región UV-A.

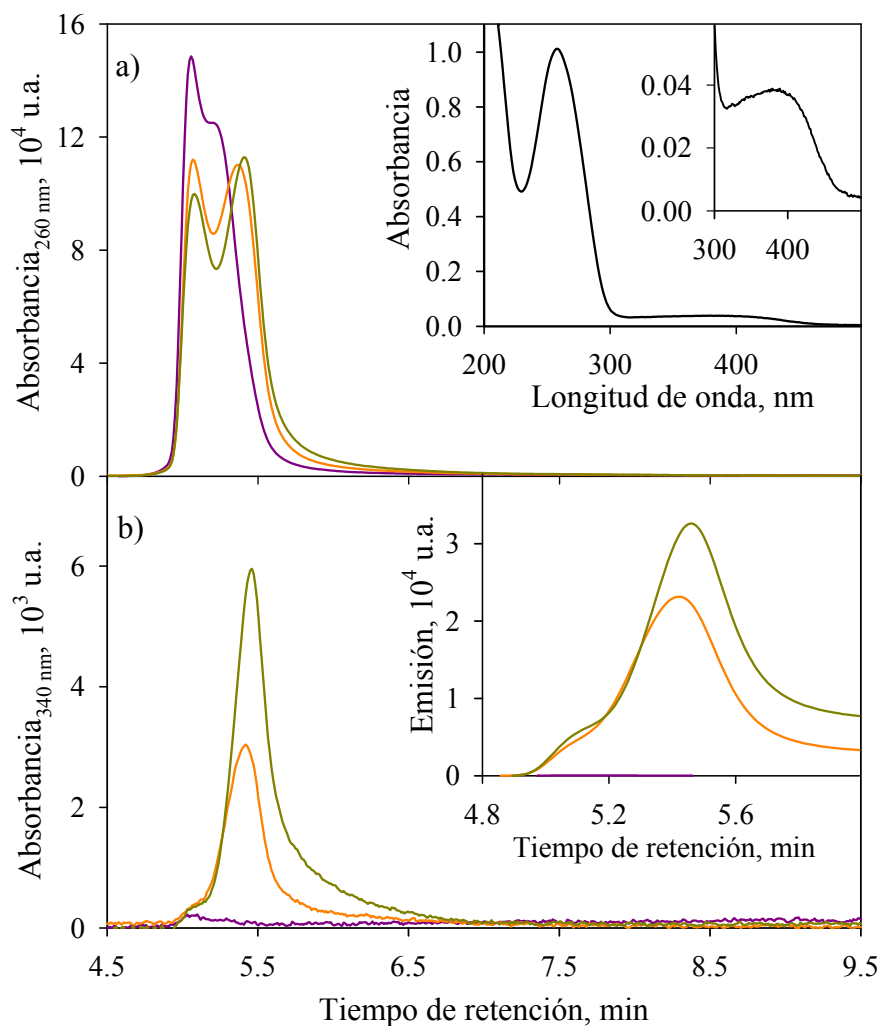


Figura 120. Análisis de HPLC de una disolución que contiene ADN y Ptr antes (línea morada), después de 60 (línea naranja) y 120 minutos (línea verde) de irradiación en ausencia de oxígeno. Cromatogramas obtenidos con a) el detector PDA a 260 nm; b) el detector PDA a 340 nm; Insets: a) espectro de absorción registrado para el pico de $t_R = 5.4$ min a los 60 min de irradiación y la ampliación de la escala entre 300 – 500 nm; b) cromatogramas obtenidos con el detector de fluorescencia ($\lambda_{ex} = 350$ nm, $\lambda_{em} = 450$ nm). $[Ptr]_0 = 150 \mu M$, $[ADN_{bp}]_0 = 150 \mu M$, $pH = 6.5 \pm 0.1$.

El producto a $t_R = 5.4$ minutos presenta un pico cromatográfico estrecho y bien definido, correspondiente a una especie de menor peso molecular que la macromolécula intacta y no a cortes aleatorios de la misma. Por lo tanto, se puede pensar que en el proceso fotosensibilizado tiene lugar la separación de las hebras del ADN debido a la incorporación de Ptr a la estructura. Este efecto se estudió siguiendo los cromatogramas a 260 nm de una muestra de ADN nativo y desnaturalizado después de calentarlo a 82 °C durante 15 minutos [Berg, 2008; Nelson, 2002]. En la Figura 121 se puede apreciar que tras la desnaturalización del ADN tiene lugar el desplazamiento del pico cromatográfico hacia tiempos de retención mayores. Con fines comparativos, se superpuso el cromatograma a 260

nm de la muestra de ADN irradiada en presencia de Ptr durante 120 minutos en condiciones anaeróbicas. Debido a que en los experimentos de desnaturalización se trabajó a la mitad de flujo que en los de fotosensibilización, fue necesario realizar una corrección en el eje x teniendo en cuenta el flujo y el tiempo muerto del equipo. En la **Figura 122** se observa que el máximo del producto obtenido al irradiar ADN en presencia de Ptr coincide con el del ADN desnaturalizado, sugiriendo que en el proceso fotosensibilizado tiene lugar la separación de las hebras de la biomolécula.

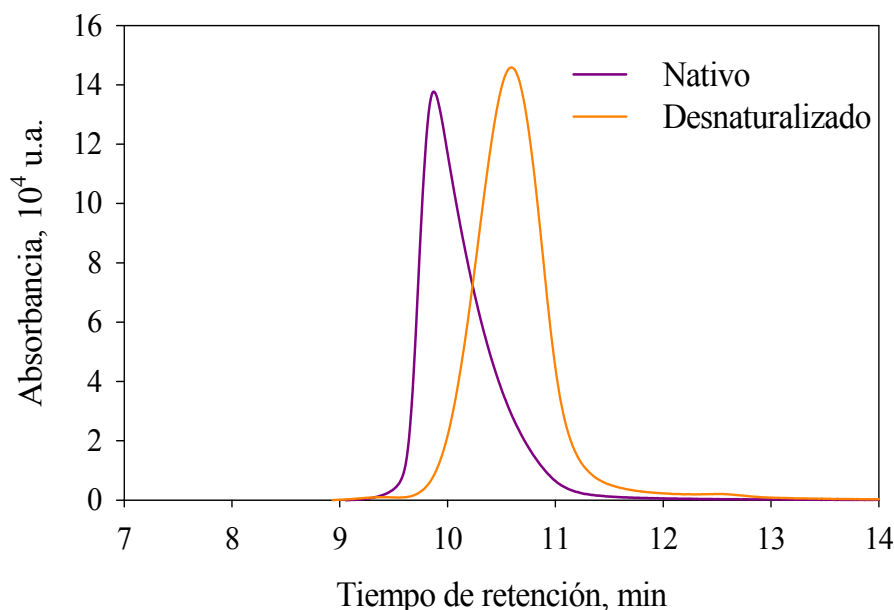


Figura 121. Cromatogramas obtenidos con el detector PDA a 260 nm a un flujo de 0.5 mL/min de una disolución de ADN nativo (línea morada) y desnaturalizado (línea naranja). $[ADN_{bp}]_0 = 150 \mu M$, $pH = 6.5 \pm 0.1$.

Como puede observarse en la **Figura 123.a**, el consumo de Ptr en presencia de ADN es ligeramente mayor que en su ausencia, indicando que su consumo se debe a su propia fotoquímica y a la reacción fotosensibilizada con el ADN. Si asumimos que el coeficiente de absorción molar de Ptr no cambia significativamente cuando ésta se enlaza a Thy para formar el aducto, la cantidad de Ptr unida a la macromolécula se puede estimar utilizando la curva de calibración del fotosensibilizador libre (**Figura 123.a**). La concentración de Ptr unida al ADN a un tiempo de irradiación intermedio, por ejemplo 90 minutos, es de $16.5 \mu M$. Esto equivale a una molécula de Ptr cada 9 pares de bases, valor sorprendentemente elevado. La velocidad de incorporación de Ptr a la molécula de ADN fue menor que la velocidad de consumo del fotosensibilizador, lo cual es razonable si se tiene en cuenta que parte del consumo de Ptr está asociado a su propia fotodegradación. La diferencia observada en el consumo de Ptr en presencia y en ausencia de ADN se corresponde, dentro del error experimental, a la cantidad de Ptr incorporada a la biomolécula de ADN (**Figura 123.a**).

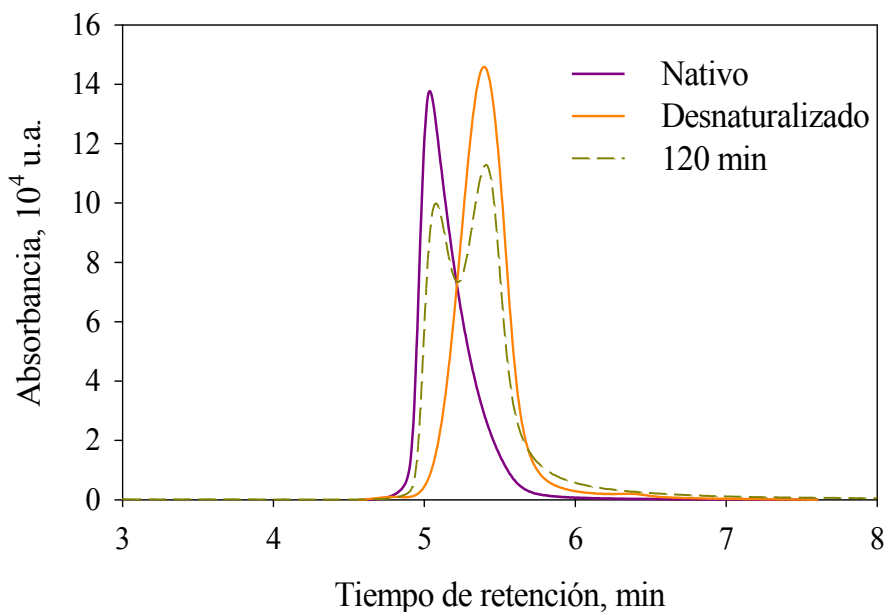


Figura 122. Cromatogramas obtenidos con el detector PDA a 260 nm de una disolución de ADN nativo (línea morada) y desnaturalizado (línea naranja) y una disolución de Ptr y ADN irradiada durante 120 minutos en ausencia de O_2 (línea verde punteada). Flujo: 1 mL/min, $[Ptr]_0 = 150 \mu M$, $[ADN_{bp}]_0 = 150 \mu M$, $pH = 6.5 \pm 0.1$.

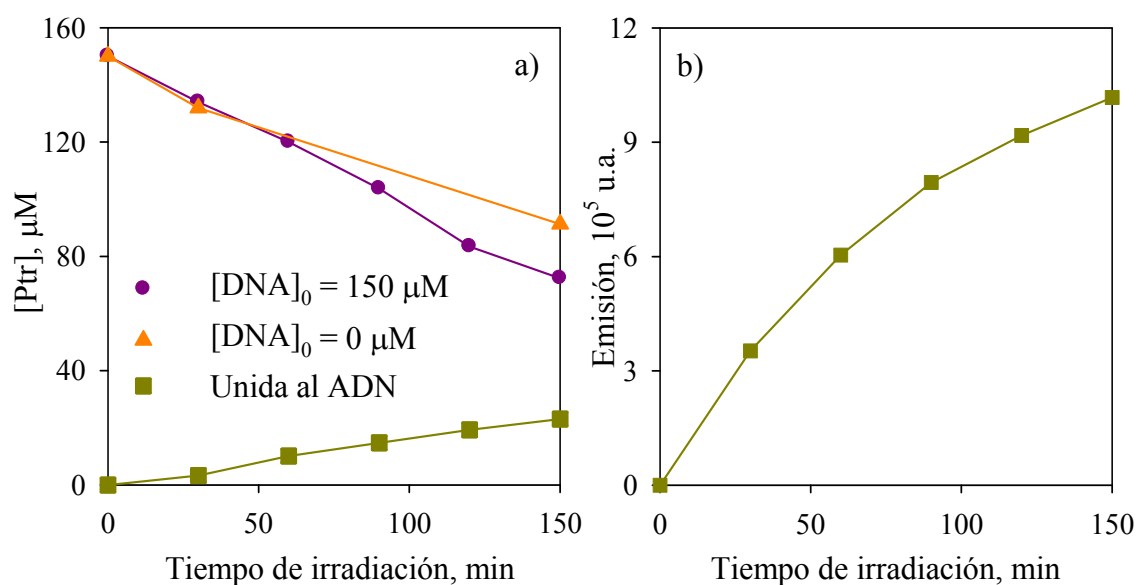


Figura 123. a) Evolución temporal de la concentración de Ptr libre y unida al ADN; b) Evolución temporal del área del pico correspondiente al producto fluorescente. $[Ptr]_0 = 150 \mu M$, $[ADN_{bp}]_0 = 150 \mu M$, $pH = 6.5 \pm 0.1$.

El análisis de los cromatogramas registrando la fluorescencia ($\lambda_{ex} = 350 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 450 \text{ nm}$) muestra, además del pico cromatográfico correspondiente a Ptr, un pico en el mismo tiempo de retención que el producto observado en los

cromatogramas registrados con el PDA (*Inset Figura 120.b*). El área de este producto fluorescente aumenta con el tiempo de irradiación (*Figura 123.b*).

Con este estudio podemos concluir que bajo irradiación en ausencia de O₂, Ptr se incorpora a la estructura del ADN y que el producto generado mantiene algunas de sus propiedades espectroscópicas, como la absorbancia en la región UV-A y su fluorescencia.

13.2. FOTOSENSIBILIZACIÓN DE ADN EUCARIOTA EN PRESENCIA DE O₂

Se realizaron experimentos equivalentes a los presentados en la sección anterior, pero en presencia de O₂. Los cromatogramas registrados a 260 nm revelan un fuerte descenso de la altura del pico cromatográfico correspondiente al ADN (*Figura 124.a*). De forma simultánea, se observa un ensanchamiento del pico y un aumento del tiempo de retención del máximo según aumenta el tiempo de irradiación. Sin embargo, el área total de los picos registrados a 260 nm permanece constante con el tiempo de irradiación. Este comportamiento sugiere que el ADN se corta de manera aleatoria en fragmentos con diferentes pesos moleculares. La fragmentación del ADN por Ptr ya había sido reportada previamente en la literatura [Ito, 1997; Hirakawa, 2003; Lorente, 2000].

Los cromatogramas de las muestras irradiadas registrados a 340 nm (*Figura 124.b*) presentan picos con formas similares a los obtenidos en los cromatogramas registrados a 260 nm. El área total de los productos con absorbancia a 340 nm aumenta vigorosamente durante los primeros 60 minutos de irradiación, alcanzando una meseta a partir de los 90 minutos (*Inset Figura 124.b*). Los espectros de absorbancia de estos productos no muestran la banda típica de absorción de las pterinas, indicando que el fotosensibilizador no se está incorporando a la macromolécula. Estos productos, que también presentan absorbancia en la región UV-A, pueden deberse a la formación de productos de oxidación de Gua [Torun, 2003; Serrano, 2017]. En el *inset* de la *Figura 124.a* se pueden ver a modo de ejemplo los espectros de absorbancia del ADN (línea rosa) y del producto obtenido tras 60 minutos de irradiación (línea morada).

Algunos de los fotoproductos presentan emisión a 450 nm cuando se les excita a 350 nm (*Figura 125*). Sin embargo, la emisión es de menor intensidad que la obtenida para los productos generados tras las irradiaciones en ausencia de O₂ (*Inset Figura 120.b*), y puede ser atribuida a alguno de los fotoproductos de Gua [Serrano, 2017]. El cromatograma registrado con el detector de fluorescencia presenta la misma forma que los registrados a 260 y a 340 nm (*Figura 124*).

La *Figura 126* muestra la evolución temporal de la concentración de Ptr en presencia y en ausencia de ADN. El consumo del fotosensibilizador es menor en presencia de ADN, al igual que ocurría cuando el sustrato era dT (*Apartado 8.1*), ya que cuando la biomolécula está presente en el medio aumenta el número de

reacciones que compiten con la oxidación de Ptr, y por lo tanto, su consumo es menor.

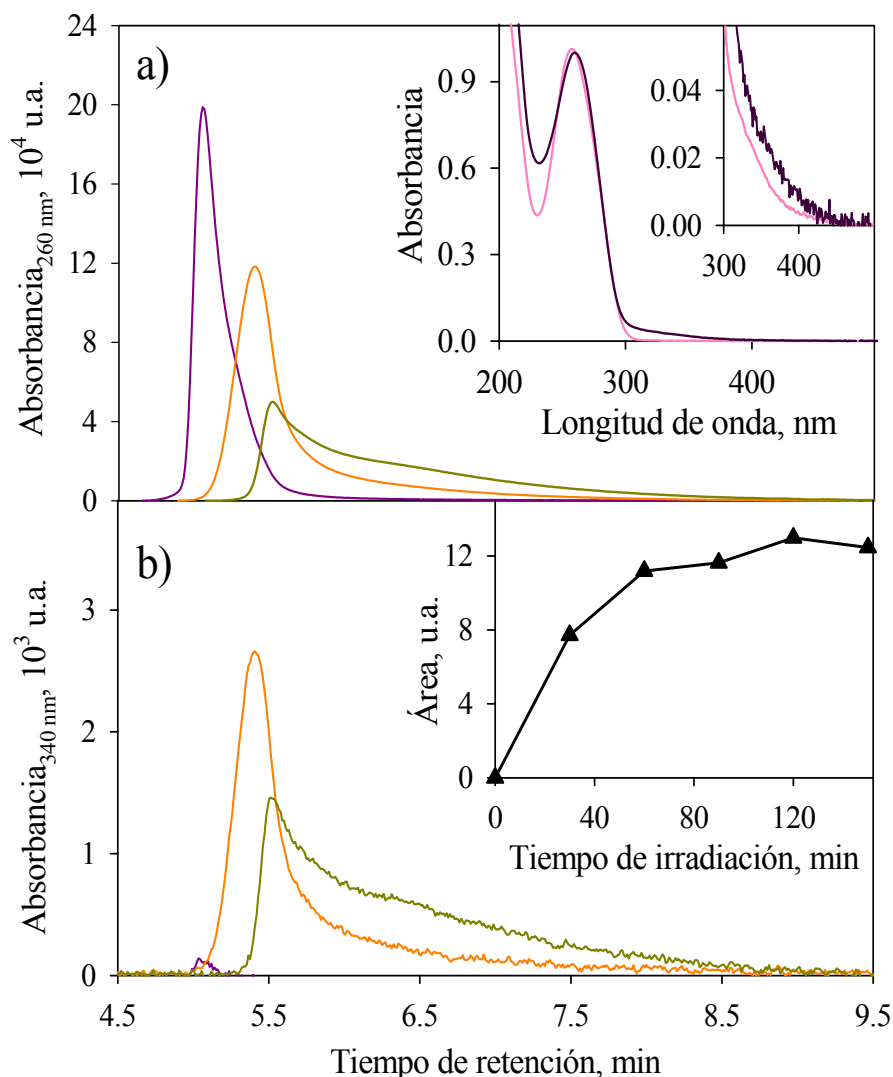


Figura 124. Análisis de HPLC de una disolución que contiene ADN y Ptr antes (línea morada), después de 60 (línea naranja) y 120 minutos (línea verde) de irradiación en presencia de O_2 . Cromatogramas obtenidos con a) el detector PDA a 260 nm; b) el detector PDA a 340 nm; Insets: a) espectro de absorción obtenido para los picos registrados antes (línea rosa) y después de 60 min de irradiación (línea morada) junto con la ampliación de la escala entre 300 – 500 nm; b) evolución temporal del área de los picos obtenidos en el cromatograma registrado a 340 nm. $[\text{Ptr}]_0 = 150 \mu\text{M}$, $[\text{ADN}_{bp}]_0 = 150 \mu\text{M}$, $\text{pH} = 6.5 \pm 0.1$.

Los resultados de este apartado evidencian que la reacción fotosensibilizada de ADN por Ptr en presencia de O_2 no da lugar a la formación de aductos Ptr–Thy. El efecto predominante observado es el corte aleatorio de la cadena de ADN, posiblemente debido a la oxidación de las Gua, como se mencionó anteriormente [Ito, 1997; Hirakawa, 2003].

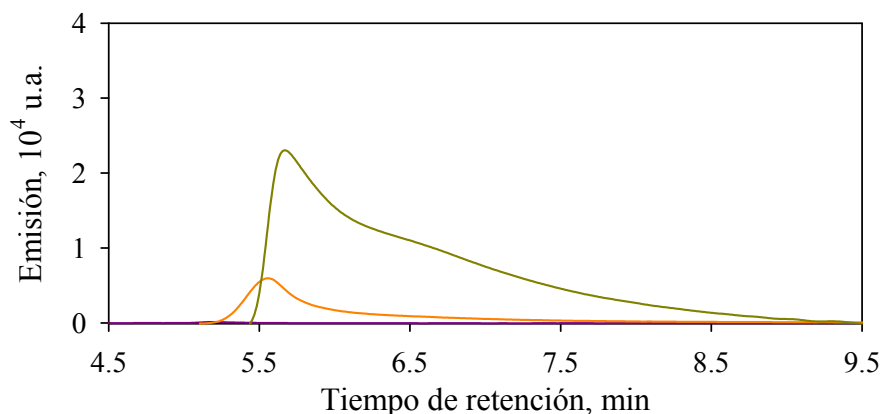


Figura 125. Análisis de HPLC de una disolución que contiene ADN y Ptr antes (línea morada), después de 60 (línea naranja) y 120 minutos (línea verde) de irradiación en presencia de O_2 . Cromatograma obtenido con el detector de fluorescencia ($\lambda_{ex} = 350 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 450 \text{ nm}$). $[Ptr]_0 = 150 \text{ } \mu\text{M}$, $[ADN_{bp}]_0 = 150 \text{ } \mu\text{M}$, $pH = 6.5 \pm 0.1$.

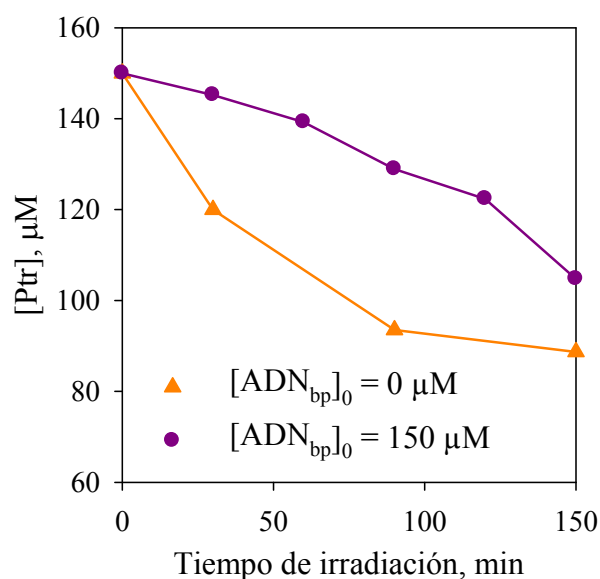


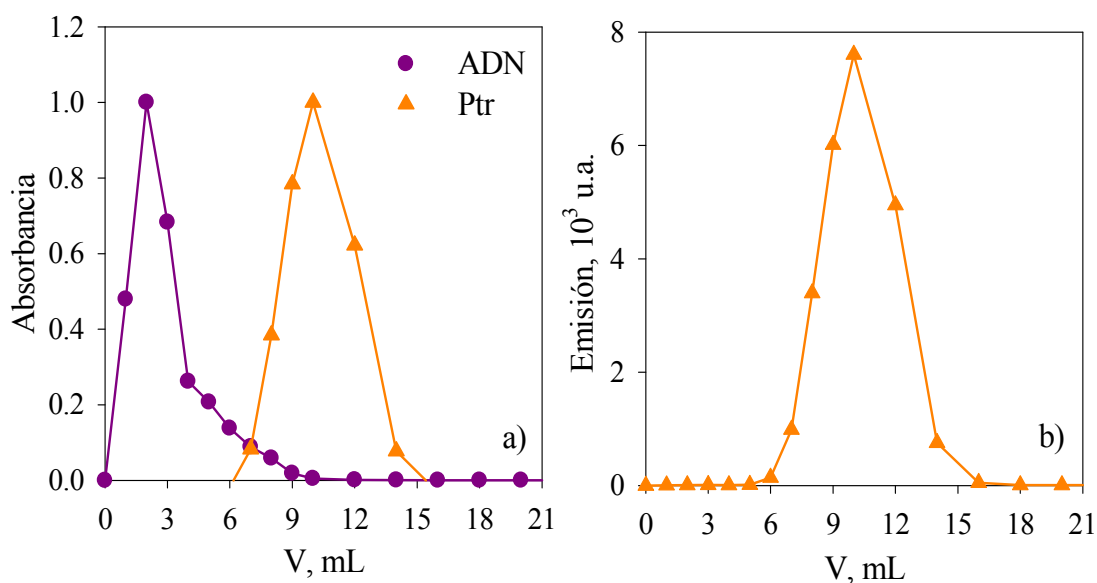
Figura 126. Evolución temporal de la concentración de Ptr en presencia y en ausencia de ADN de las muestras irradiadas en presencia de O_2 . $[Ptr]_0 = 150 \text{ } \mu\text{M}$, $[ADN_{bp}]_0 = 150 \text{ } \mu\text{M}$, $pH = 6.5 \pm 0.1$.

13.3. PROPIEDADES FLUORESCENTES DEL ADUCTO PTERINA–TIMINA GENERADO EN ADN

Para estudiar las propiedades fluorescentes de los fotoproductos obtenidos en la reacción fotosensibilizada de ADN por Ptr, la fracción de ADN que contiene

aducto se purificó para eliminar el exceso de Ptr libre. Para ello, las muestras se pasaron a través de columnas de *sephadex* siguiendo el protocolo descrito en el [Apartado 6.4](#) de la sección de [Materiales y métodos experimentales](#).

Antes de analizar los fotoproductos, se realizaron controles para corroborar que la fracción obtenida tras la purificación con las columnas de *sephadex* no contiene ningún resto de Ptr libre. Se preparó una disolución de ADN en TRIS 10 mM y se pasó a través de una columna de *sephadex*. Se recolectaron fracciones cada 1 mL de eluente y se registraron los espectros de absorción. Representando la absorbancia a diferentes longitudes de onda se puede saber qué contiene cada fracción. Siguiendo la absorbancia a 260 nm se puede observar que el ADN sale tras agregar entre 0 y 4 mL de disolución tampón ([Figura 127.a](#), línea morada). Con la absorbancia a 340 nm se detectó que el fotosensibilizador se encuentra en las fracciones eluidas con un volumen comprendido entre 6 y 15 mL ([Figura 127.a](#), línea naranja), debido al menor tamaño de Ptr. Para asegurar que Ptr no sale de la columna antes de eluir la muestra con al menos 6 mL de disolución tampón, las muestras se analizaron también con el espectrofluorímetro ([Figura 127.b](#)).



*Figura 127. Absorbancia a 260 nm (línea morada) y a 340 nm (línea naranja) (a) e intensidad de emisión a 440 nm ($\lambda_{ex} = 350$ nm) (b) en función del volumen de elución de disoluciones de Ptr y ADN pasadas a través de columnas de *sephadex*. $[Ptr] = 150 \mu M$, $[ADN_{bp}] = 150 \mu M$, $pH = 6.5 \pm 0.1$.*

Se estableció un volumen de elución de 3.5 mL para la obtención del ADN sin ningún resto de Ptr libre. Por lo tanto, toda la emisión a 440 nm que se detecte tras eluir con 3.5 mL de disolución tampón las muestras de Ptr y ADN irradiadas, corresponde a Ptr que se haya unido de forma covalente al ADN.

Una mezcla de Ptr y ADN irradiada durante tres horas en condiciones anaeróbicas se pasó por una columna de *sephadex* y se registró la intensidad de

emisión a 440 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 350$ nm) para diferentes volúmenes de elución (Figura 128). Si comparamos el perfil de elución obtenido (línea azul) con el de una muestra de Ptr sin irradiar (línea naranja), podemos ver un cambio significativo entre ambos perfiles. El pico de Ptr que sale entre los 6 y los 15 mL de la disolución de Ptr sin irradiar se ensancha tras la irradiación en presencia de ADN, desplazándose hacia volúmenes de elución menores. Concretamente, parte de Ptr sale en la misma región del ADN (entre los 2 y los 6 mL). Esto indica que parte del fotosensibilizador se encuentra unido covalentemente a la biomolécula.

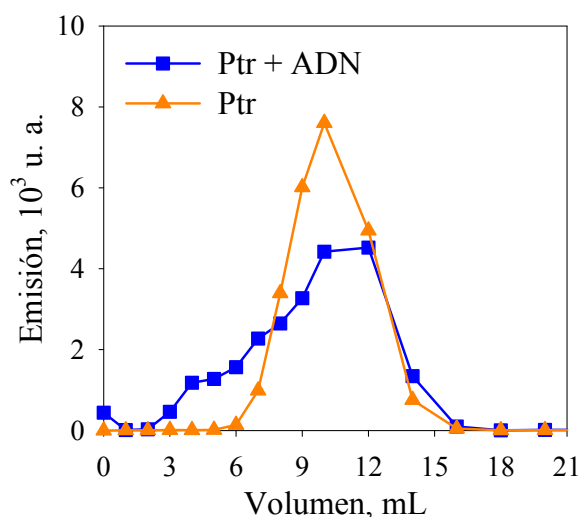


Figura 128. Intensidad de emisión a 440 nm en función del volumen de elución de una disolución de Ptr (línea naranja) y de una mezcla de Ptr y ADN irradiada durante 3 horas en ausencia de O_2 (línea azul). Las muestras se pasaron a través de columnas de sephadex. $[Ptr] = 150 \mu M$, $[ADN_{bp}] = 150 \mu M$, $\lambda_{\text{ex}} = 350$ nm, $pH = 6.5 \pm 0.1$.

Disoluciones de Ptr y ADN en proporción 1:1 se irradiaron durante diferentes tiempos en condiciones anaeróbicas. Las muestras se purificaron con las columnas de *sephadex* y se registraron los espectros de absorción ($\lambda \approx 350$ nm) y emisión ($\lambda_{\text{ex}} = 350$ nm) de las fracciones aisladas con 3.5 mL de eluente (Figura 129). El tiempo de incubación se mantuvo constante para todas las muestras. La intensidad de emisión aumenta progresivamente con el tiempo de irradiación, indicando que el proceso fotoquímico genera productos fluorescentes que se acumulan al menos hasta las 4 horas de irradiación. La intensidad de los espectros de excitación también aumenta con el tiempo de irradiación (*Inset* Figura 129). Los espectros de emisión ($\lambda_{\text{máx.}} = 442$ nm) y excitación son muy similares a los reportados para Ptr libre [Lorente, 2006].

Se realizó un control irradiando mezclas de Ptr y ADN en presencia de O_2 y, posteriormente, purificándolas con las columnas de *sephadex*. Se registraron los espectros de emisión y excitación en las mismas condiciones que las utilizadas en el análisis de las muestras irradiadas en ausencia de O_2 (Figura 129, línea

punteada). Después de cuatro horas de irradiación, las muestras irradiadas en presencia de O_2 presentan fluorescencia, con una intensidad más baja y con el máximo desplazado ligeramente hacia longitudes de onda mayores respecto de la muestra irradiada durante una hora en condiciones anaeróbicas. El espectro de excitación está fuertemente desplazado hacia longitudes de onda mayores, con su máximo centrado en torno a los 400 nm, coincidente con productos fluorescentes de Gua, previamente reportados [Serrano, 2017].

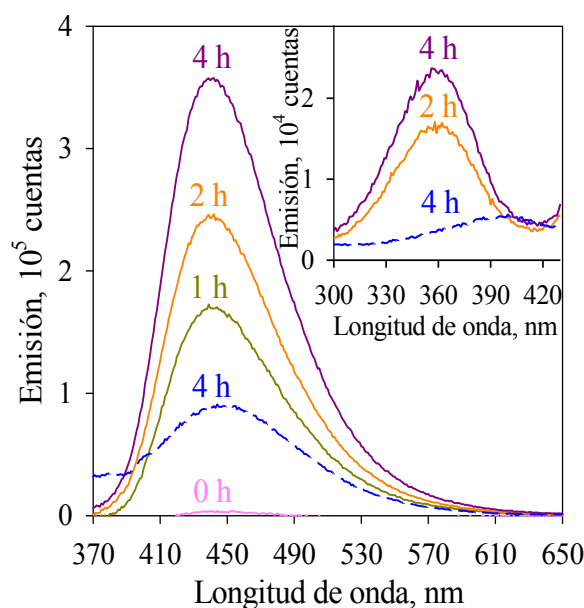


Figura 129. Espectros de emisión ($\lambda_{ex} = 350$ nm) de las muestras de Ptr y ADN irradiadas durante diferentes tiempos en ausencia de O_2 (líneas continuas). A modo comparativo, las muestras se irradiaron en presencia de O_2 (líneas discontinuas). Inset: correspondientes espectros de excitación obtenidos a 440 nm. Todas las muestras fueron purificadas con columnas de sephadex. Los tiempos de irradiación aparecen encima de cada espectro. $[Ptr] = 150 \mu M$, $[ADN_{bp}] = 150 \mu M$, $pH = 6.5 \pm 0.1$.

En estudios de fluorescencia resueltos en el tiempo, las muestras de ADN irradiadas en presencia de Ptr en condiciones anaeróbicas y purificadas con las columnas de *sephadex*, presentan un decaimiento biexponencial (Figura 130). Del ajuste biexponencial de la curva se obtuvieron los tiempos de vida $\tau_{F1} = 8.3 \pm 0.4$ ns y $\tau_{F2} = 1.7 \pm 0.4$ ns con sus correspondientes factores pre-exponenciales $B_1 = 0.03$ y $B_2 = 0.04$, valores del orden a los obtenidos para el aducto generado en dT₅ (2.2 y 6.4 ns). Además, el valor del tiempo de vida largo es similar al reportado para Ptr libre en disolución acuosa (7.6 ns) [Lorente, 2006].

En resumen, los rendimientos de los procesos químicos fotoinducidos por Ptr en la macromolécula de ADN dependen fuertemente de la presencia de O_2 en el medio. En disoluciones equilibradas en aire, tiene lugar la oxidación de los residuos de Gua con escisión aleatoria de las hebras del ADN, mientras que en

ausencia de O_2 , se forma el aducto Ptr–Thy. Estos procesos pueden ocurrir *in vivo* dado que el valor de la concentración de O_2 en los sistemas biológicos se encuentra entre estas dos condiciones. En determinados tejidos la concentración de O_2 puede ser realmente baja [Carreau, 2011], y además, Ptr puede atravesar libremente las biomembranas [Thomas, 2016]. Otro aspecto relevante del estudio es que se trabajó con concentraciones de Ptr del mismo orden que las determinadas para las pterinas oxidadas encontradas en células cutáneas enfermas, como por ejemplo, queratinocitos humanos y en cultivos de células [Schallreuter, 2001]. Por ello, la formación del aducto Ptr–Thy en ADN celular no puede descartarse. Sus propiedades espectroscópicas, especialmente su fluorescencia, hacen que se pueda pensar en su uso como sonda fluorescente de ADN. Además, su capacidad para generar 1O_2 le convierte en un posible fotosensibilizador intrínseco del ADN.

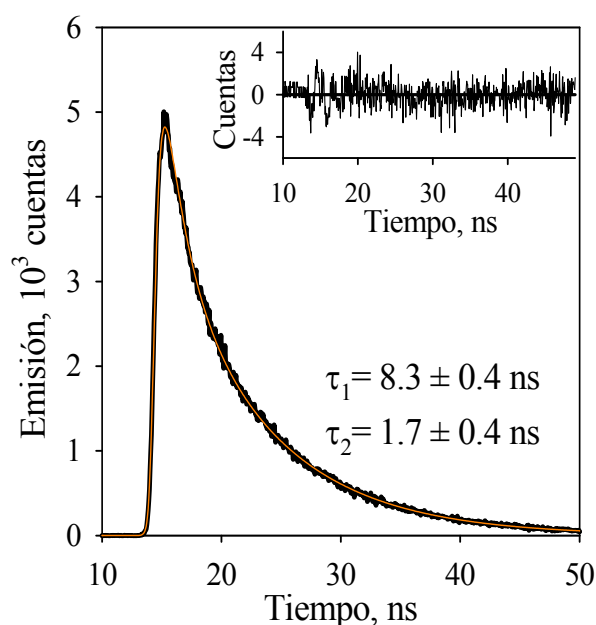


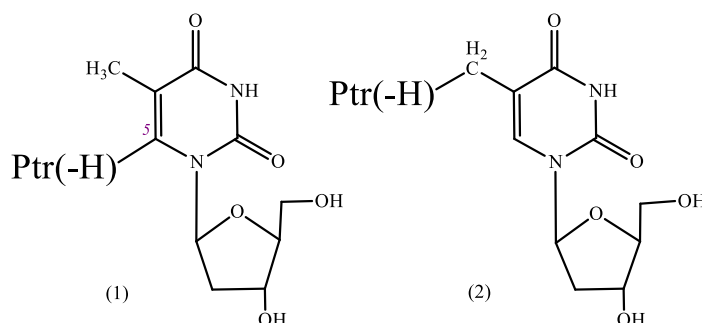
Figura 130. Decaimientos de emisión registrados a 450 nm ($\lambda_{ex} = 341$ nm) de las muestras de ADN y Ptr irradiadas en condiciones anaeróbicas. Inset: análisis de los residuos. $[Ptr] = 150 \mu M$, $[ADN_{bp}] = 150 \mu M$, $pH = 6.5 \pm 0.1$.

iv) CONCLUSIONES

CONCLUSIONES GENERALES

En el presente trabajo de tesis doctoral se estudió la fotosensibilización del ADN y sus componentes inducida por pterina (Ptr) bajo diferentes condiciones experimentales. Concretamente, se analizó la formación de aductos fluorescentes entre Ptr y los componentes del ADN. A continuación se detallan las conclusiones más relevantes obtenidas durante el desarrollo de esta tesis:

- Ptr es capaz de fotoinducir modificaciones químicas en timina (Thy) a través de un mecanismo de reacción iniciado con la transferencia electrónica desde la base nitrogenada al estado excitado triplete de Ptr. La reacción se ve fuertemente influenciada por la concentración de O_2 del medio, existiendo dos vías diferentes en función de la presencia o no de esta especie.
- En presencia de O_2** , tiene lugar la oxidación de la base nitrogenada. Los productos identificados por espectrometría de masas fueron 5,6-dihidroxi-5,6-dihidrotimidina (timidina glicol), 5-(hidroximetil)-2'-desoxiuridina y 5-formil-2'-desoxiuridina.
- En ausencia de O_2** , se forman aductos fluorescentes como resultado de la recombinación entre el radical anión de Ptr y el radical neutro de Thy. Los aductos Ptr-dT poseen masas correspondientes a la suma de las masas de Ptr y dT con pérdida de dos átomos de hidrógeno ($[Ptr+dT-2H]$).
- No se encontraron diferencias significativas entre la reactividad del nucleósido (2'-desoxitimidina, dT) y del nucleótido (2'-desoxitimidina 5'-monofosfato), tanto en presencia como en ausencia de O_2 .
- La formación de aductos tiene lugar exclusivamente con las bases pirimidínicas, siendo el proceso mucho más lento para citosina (Cyt) que para Thy.
- El estudio de espectrometría de masas reveló la formación de al menos dos aductos Ptr-dT. En la unión de las dos estructuras participan los C6 o C7 de Ptr y el C5 o el grupo metilo de dT. Las estructuras propuestas se muestran a continuación.



- ✚ Se aisló y se caracterizó fotoquímicamente el aducto 1. Las propiedades fotofísicas del sensibilizador se mantienen prácticamente invariables en el aducto. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla.
- ✚ Se investigó la generación de aductos en los siguientes oligonucleótidos de cadena simple: 5'-d(TTTTT)-3' (dT₅), 5'-d(CCCCC)-3' (dC₅), 5'-d(GGGGG)-3' (dG₅), 5'-d(TTGTT)-3' (TTGTT) y 5'-d(GTTTT)-3' (GTTTT). La información más relevante obtenida en este estudio se detalla a continuación:
 - La reacción es más favorable con dT₅ que con dC₅.
 - En dT₅ se enlazan al menos dos moléculas de Ptr.
 - La presencia de guanina en la cadena no evita la formación del aducto.
- ✚ Al igual que el aducto Ptr-dT, el aducto formado en dT₅ (Ptr-dT₅) mantiene las propiedades espectroscópicas de Ptr (ver tabla).
- ✚ El aducto Ptr-Thy también se forma en un oligonucleótido de doble hebra (dA₁₀-dT₁₀), llegando a enlazarse hasta dos residuos de Ptr sobre la cadena de dT₁₀.
- ✚ Ptr fotoinduce modificaciones químicas en el ADN, en un proceso dependiente de la concentración de O₂ del medio. En disoluciones equilibradas en aire, las hebras del ADN se escinden aleatoriamente, mientras que en ausencia de O₂, se forman aductos Ptr-Thy.
- ✚ El aducto Ptr-Thy generado en la biomacromolécula de ADN (Ptr-ADN) presenta propiedades espectroscópicas similares a las del fotosensibilizador (ver tabla).

	Ptr	Ptr-dT	Ptr-dT ₅	Ptr-ADN
Absorción (λ _{máx} , nm)	340 ± 1	340 ± 1	333 ± 1	~ 350 ± 1
Emisión (λ _{máx} , nm)	440 ± 1	437 ± 1	436 ± 1	442 ± 1
Φ_F	0.32 ± 0.01	0.29 ± 0.02	-	-
τ_{F1}, τ_{F2} (ns)	7.6 ± 0.4	7.2 ± 0.1	6.4 ± 0.4 2.2 ± 0.4	8.3 ± 0.4 1.7 ± 0.4
Φ_Δ	0.18 ± 0.02	0.07 ± 0.01	-	-

v) BIBLIOGRAFÍA

A

Albert, A. *Biochem. J.* **1953**, *54*, 640–646.

Aronoff, S. *Science* **1965**, *150*, 72–73.

Ayling, J. E.; Rebrin, I.; Thöny, B.; Bailey, S. W. In *Chemistry and Biology of Pteridines and Folates*; Pfeleiderer, W.; Rokos, R., Eds.; Blackwell Science: Berlin, **1997**; pp 565–570.

B

Bald, I.; Flosadóttir, H. D.; Ómarsson, B.; Ingólfsson, O. *International Journal of Mass Spectrometry*. **2012**, *313*, 15–20.

Banyasz, A.; Vayá, I.; Changenet-Barret, P.; Gustavsson, T.; Douki, T.; Markovitsi, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 5163–5165.

Baptista, M. S.; Cadet, J.; Di Mascio, P.; Ghogare, A. A.; Greer, A.; Hamblin, M. R.; Lorente, C.; Nunez, S. C.; Ribeiro, M. S.; Thomas, A.; Vignoni, M.; Yoshimura, T. *M. Photochemistry and Photobiology* **2017**, *93*, 912–919.

Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L. *Bioquímica*, 6th ed.; **2008**.

Bosca, F.; Lhiaubet-Vallet, V.; Cuquerella, M.C.; Castell, J.V.; Miranda, M.A. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6318–6319.

Bourdelande, J.; Nonell, S.; Acuña, A.; Sastre, R. *Glosario de términos usados en fotoquímica*, **1999**.

Braslavsky, S. E. *Pure and Applied Chemistry* **2007**, *79*, 293–465.

Braun, A.; Maurette, M.; Oliveros, E.; Serpone, N. *Photochemical technology*, **1991**; *Vol. 104*.

Brown, T. A. in *Genomas 3a Ed* (ed. Panamericana) **2008**.

Burrows, C. J.; Muller, J. G. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1109–1152.

C

Cabrerizo, F.; Thomas, A. *Helvetica Chimica Acta* **2004**, *87*, 349–365.

Cabrerizo, F. M.; Lorente, C.; Vignoni, M.; Cabrerizo, R.; Capparelli, A. L. *Photochemistry and photobiology* **2005**, *81*, 793–801.

Cabrerizo, R.; Vignoni, M.; Erra-Balsells, R.; Franco, M.; Capparelli, A. L.; Thomas, A. H.; Cabrerizo, F. M. *Helvetica Chimica Acta* **2006**, *89*, 1090–1104.

Cabrerizo, F. M.; Dántola, M. L.; Petroselli, G.; Capparelli, A. L.; Thomas, A.; Braun, A. M.; Lorente, C.; Oliveros, E. *Photochemistry and Photobiology* **2007**, *83*, 526–534.

Cadet, J.; Treoule, R. *Photochemistry and Photobiology* **1978**, *28*, 661–667.

Cadet, J.; Anselmino, C.; Douki, T.; Voituriez, L. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **1992**, *15*, 277–298.

Cadet, J.; Berger, M.; Buchko, G. W.; Incardona, M.-F.; Morin, B.; Raoul, S.; Ravanat, J. In *Oxidative Processes and Antioxidants*; Paoletti, R.; Samuelsson, B., Eds.; Raven Press: New York, **1995**, 97–115.

Cadet, J. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **2003**, *531*, 5–23.

Cadet, J.; Courdavault, S.; Ravanat J. L.; Douki T. *Pure Appl. Chem.* **2005**, *77*, 947–961.

Cadet, J.; Wagner, J. R. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2013**, *5*.

Cadet, J.; Wagner, J. R.; Shafirovich, V.; Geacintov, N. E. *Int. J. Radiat. Biol.* **2014**, *90*, 423–432. (a)

Cadet, J.; Wagner, J. R. *Arch. Biochem. Biophys.* **2014**, *557*, 47–54. (b)

Cadet, J.; Grand, A.; Douki, T. *Top Curr. Chem.* **2015**, *356*, 249–275.

Carreau, A.; Hafny-Rahbi, B.; Matejuk, A.; Grillon, C.; Kieda, C. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **2011**, *15* (6), 1239–1253.

Castañó, C.; Dántola, M. L.; Oliveros, E.; Thomas, A. H.; Lorente, C. *Photochemistry and photobiology* **2013**, *89* (6), 1448–1455.

Castañó, C.; Lorente, C.; Martins-Froment, N.; Oliveros, E.; Thomas, A. H. *Organic & biomolecular chemistry* **2014**, *12*, 3877–86.

Castañó, C.; Serrano, M. P.; Lorente, C.; Borsarelli, C.; Thomas, A. H. *Photochemistry and Photobiology* **2019**, en prensa.

Cavaluzzi, M. J.; Borer, P. N. *Nucleic acids research* **2004**, *32*, e13.

Chahidi, C.; Aubailly, M.; Momzikoff, A.; Bazin, M.; Santus, R. *Photochemistry and Photobiology* **1981**, *33*, 641–649.

Coohill, T. P.; Peak, M. J.; Peak, J. G. *Photochemistry and Photobiology* **1987**, *46*,

1043–1050.

Cuquerella, M. C.; Lhiaubet-Vallet, V.; Bosca, F.; Miranda, M. A. *Chemical Science* **2011**, *2*, 1219–1232.

Cuquerella, M. C.; Lhiaubet-Vallet, V.; Cadet, J.; Miranda, M. A. *Accounts of chemical research* **2012**, *45*, 1558–70.

Curtius, H. C.; Matasovic, A.; Schoedon, G.; Kuster, T.; Guibaud, P.; Giudici, T.; Blau, N. *Journal of Biological Chemistry* **1990**, *265*, 3923–3930.

D

Dántola, M. L.; Thomas, A.; Braun, A. M.; Oliveros, E.; Lorente, C. *The Journal of Physical Chemistry* **2007**, *2*, 4280–4288.

Dántola, M. L.; Schuler, T. T. M.; Paula Denofrio, M.; Vignoni, M.; Capparelli, A. L.; Lorente, C.; Thomas, A. H.; Dántola, M. L. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 8692–8699.

Dántola, M. L.; Ph.D. thesis; La Plata; **2008**.

Dántola, M. L.; Vignoni, M.; González, C.; Lorente, C.; Vicendo, P.; Oliveros, E.; Thomas, A. *Free Radical Biology & Medicine* **2010**, *49*, 1014 – 1022.

Dántola, M. L.; Gojanovich, A. D.; Thomas, A. H. *Biochemical and biophysical research communications* **2012**, *424*, 568–72.

Davis, M. D.; Ribeiro, P.; Tipper, J.; Kaufman, S. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1992**, *89*, 10109–10113.

Daya-Grosjean, L.; Sarasin, A. *Mutation research* **2005**, *571*, 43–56.

Decarroz, C.; Wagner, J. R.; van Lier, J. E.; Krishna, C. M.; Riesz, P.; Cadet, J. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* **1986**, *50*, 491– 505.

Delatour, T.; Douki, T.; D’Ham, C.; Cadet, J. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **1998**, *44*, 191–198.

Denofrio, M.; Hatz, S. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2009**, *8*, 1539–49.

Denofrio, M. P.; Lorente, C.; Breitenbach, T.; Hatz, S.; Cabrerizo, F. M.; Thomas, A. H.; Ogilby, P. R. *Photochemistry and Photobiology* **2011**.

Denofrio, M. P.; Ogilby, P. R.; Thomas, A. H.; Lorente, C. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2014**, *13*, 1058 – 65.

Dumat, B.; Bordeau, G.; Faurel-Paul, E.; Mahuteau-Betzer, F.; Saettel, N.; Metge, G.; Fiorini-Debuisschert, C.; Charra, F.; Teulade-Fichou, M.P. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**,

28, 135.

I

Egorov, S.Y.; Krasnovsky, A.A.; Bashtanov, M.Y.; Mironov, E.A.; Ludnikova, T.A.; Kritsky, M. S. *Biochemistry* **1999**, *64*, 1117–1121.

Eriksen, J.; Foote, C. S.; Parker, T. L. *Journal of the American Chemical Society* **1977**, *99*, 6455–6456.

Estébanez, S.; Thomas, A.; Lorente, C. *Photochemistry and Photobiology* **2018**, *94*, 881–889.

J

Foote, C. *Photochemistry and photobiology* **1991**, *54*, 659–659.

Foote, C. S.; Clennan, E. L.; Valentine, J. S.; Greenberg, A.; Liebman, J. F. In *Active Oxygen in Chemistry* **1995**, 105–140.

Fuchs, D.; Weiss, G.; Reibnegger, G.; Watchter, H. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sciences* **1992** *29*, 3, 307.

G

Gadiparthi, N. R.; Carlier, E. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **1985**, *26*, 768–770.

Gasparro, F. P. In *Sunscreen Photobiology*; Springer-Verlag: New York, **1997**.

Giese, B. *Accounts of Chemical Research* **2000**, *33*, 631–636.

Gilbert, V. A.; Baggott, J. *Essentials of Molecular Photochemistry*; Blackwell Scientific Publications: Oxford, **1991**.

Guidi, G.; Giuffrida, S.; Condorelli, G.; Costanzo, L. L.; Miano, P.; Sortino, S. *Photochemistry and Photobiology* **1996**, *63*, 455–462.

H

Harm, W. IUPAB Biophysics Series 1 (Eds.: F. Hutchinson, W. Fuller, L. Mullins), Cambridge University Press, Cambridge, **1980**.

Henderson, P. T.; Delaney, J. C.; Muller, J. G.; Neeley, W. L.; Tannenbaum, S. R.; Burrows, C. J.; Essigmann, J. M. *Biochemistry* **2003**, *42*, 9257–9262.

Hettich, R. L.; Jacobson, K. B. *Journal of mass spectrometry*. **1995**, *30*, 872 – 884.

Hevel J. M.; Marietta, M. A. *Biochem.*, **1992**, *31*, 7160.

Hirakawa, K.; Suzuki, H.; Oikawa, S.; Kawanishi, S. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2003**, *410*, 261–268.

Hiraku, Y.; Ito, K.; Hirakawa, K.; Kawanishi, S. *Photochemistry and photobiology* **2007**, *83*, 205–12.

Hodgson, E. K.; Fridovich, I. *Photochemistry and Photobiology* **1973**, *18*, 451–455.

Hopkins, F. G. *Proceedings of the Chemical Society, London* **1889**, *5*, 117.

Hopkins, F. G. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B* **1895**, *186*, 661–682.

Hopkins, F. G. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B - Biological Sciences* **1942**, *130*, 359–379.

Huang, C. Y.; Max, E. E.; Kaufman, S. *Journal of Biological Chemistry* **1973**, *248*, 4235–4241.

II

Ito, K.; Kawanishi, S. *Biochemistry* **1997**, *36*, 1774–1781.

Jl

Jablonski, N.; Chaplin, G. J. *Hum. Evol.* **2000**, *39*, 57–106.

K

Kahn, A. U. *Chem. Phys. Lett.* **1980**, *72*, 112.

- Kaufman, S. *Journal of Biological Chemistry* **1970**, *245*, 4751–4759.
- Klán, P.; Wirz, J. *Photochemistry of Organic Compounds: From Concepts to Practice*; John Wiley and Sons Ltd.: Chichester, **2009**.
- Koning, T. M. G.; Davies, R. J. H.; Kaptein, R. *Nucleic Acids Research* **1990**, *18*, 277–284.
- Krasnovsky A. A., Jr., *Biophysics* **1979**, *24*, 769.
- Kühn, A.; Egelhaf, A. Z. *Naturforsch.* **1959**, *14b*, 654.
- Kumar, S.; Sharma, N. D.; Davies, R. H.; Phillipson, D. W.; McCloskey, J. A. *Nucleic Acids Research* **1987**, *15*, 1199–1216.
- Kumar, C. V.; Asuncion, E. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8547–8553.

L

- Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed.; Springer, **2006**.
- Ledbetter, J. W.; Pfeleiderer, W.; Freisheim, J. H. *Photochemistry and Photobiology* **1995**, *62*, 71–81.
- Lederer, M. *Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc.* **1940**, *15*, 273.
- Lorente, C.; Thomas, A. H.; Villata, L. S.; Hozbor, D.; Lagares, A.; Capparelli, A. L. *Pteridines* **2000**, *11*, 100–105.
- Lorente, C.; Capparelli, A. L.; Thomas, A. H.; Braun, A. M.; Oliveros, E. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2004**, *3*, 167–173.
- Lorente, C.; Thomas, A. *Accounts of chemical research* **2006**, *39*, 395–402.
- Luo, W.; Muller, J. G.; Rachlin, E. M.; Burrows, C. J. *Organic Letters* **2000**, *2*, 613–616.

M

- Maharaj, G.; Selinsky, B. S.; Appleman, J. R.; Perlman, M.; London, R. E.; Blakley, R. L. *Biochemistry* **1990**, *29*, 4554–4560.
- Martinez, L. A.; Martinez, C. G.; Klopotek, B. B.; Lang, J.; Neuner, A.; Braun, A. M.; Oliveros, E. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2000**, *58*,

94–107.

Matsumura, Y.; Ananthaswamy, H. N. *Toxicology and applied pharmacology* **2004**, *195*, 298–308.

McCluckey, S. A.; Berkel, G. J.; Glush, G. L. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1992**, *3*, 60–70.

Miñan, A. G.; Lorente, C.; Ipiña, A. H.; Thomas, A. H.; Fernández, M. A. L.; Schilardi, P. L. *Biofouling* **2015**, *31*, 459–468.

Misiaszek, R.; Crean, C.; Joffe, A.; Geacintov, N. E.; Shafirovich, V. *The Journal of biological chemistry* **2004**, *279*, 32106–15.

Misuraca, G.; Prota, G.; Bagnara, J. T.; Frost, S. K. *Comp. Biochem. Physiol.* **1977**, *57B*, 41.

Momzikoff, A.; Santus, R. Sur les proprietes photosensibilisatrices des pterines. Exemple de la biopterine. Comparaisons avec la riboflavine **1981**, *293*, 15–18.

Monópoli, V. D.; Thomas, A. H.; Capparelli, A. L. *International Journal of Chemical Kinetics* **2000**, *32*, 231–237.

Moore, J.; Wood, J. M.; Schallreuter, K. U. *Journal of Raman Spectroscopy* **2002**, *33*, 610–617.

Mouret, S.; Baudouin, C.; Charveron, M.; Favier, A.; Cadet, J.; Douki, T. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, *103*, 13765–70.

Muller-Sterl, W. *Bioquímica: fundamentos para medicina y ciencias de la vida* **2008**.

Murata, S.; Ichinose, H.; Urano, F. *Topics in Heterocyclic Chemistry*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg **2007**, *8*, 127–171.

Murr, C.; Neurauter, G.; Wirleitner, B.; Fuchs, D. *International Eurogin-East conference* **2001**.

N

Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Lehninger Principios de Bioquímica*, **2002**; Vol. 2.

Neverov, K.; Mironov, E.A.; Lyudnikova, T.A.; Krasnovsky, A.A.; Kritsky, M. S. *Biochemistry* **1996**, *61*, 1149–1155.

O

O'Connor, T.; Mansy, S.; Bina, M.; McMillin, D. R.; Bruck, M. A.; Tobias, R. S. *Biophys. Chem.* **1981**, *15*, 53–64.

Offer, T.; Ames, B. N.; Bailey, S. W.; Sabens, E. A.; Nozawa, M.; Ayling, J. E. *FASEB Journal* **2007**, *21*, 2101–2107.

Ogilby, P. R.; Foote, C. S. *Journal of the American Chemical Society* **1983**, *105*, 3423–3430.

Oliveros, E.; Dántola, M. L.; Vignoni, M.; Thomas, A.; Lorente, C. *Pure Appl. Chem.* **2011**, *83*, 801–811.

P

Parker, R. T. *Analytical Chemistry* **1979**, *51*, 1921–1926.

Petroselli, G.; Erra-Balsells, R.; Cabrerizo, F.M.; Lorente, C.; Capparelli, A.L.; Braun, A. M. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 2792–2799.

Petroselli, G.; Dántola, M.L.; Cabrerizo, F.M.; Capparelli, A.L.; Lorente, C.; Oliveros, E.; Thomas, A. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 3001–3011.

Petroselli, G.; Dántola, M. L.; Cabrerizo, F. M.; Lorente, C.; Braun, A. M.; Oliveros, E.; Thomas, A. H. *The journal of physical chemistry. A* **2009**, *113*, 1794–9.

Pfleiderer, W. *Journal of Inherited Metabolic Disease* **1978**, *1*, 54–60.

Pfleiderer, W. Chemistry and properties of dihydropterins, in *Biochemical and Clinical Aspects of Pteridines*; Pfeleiderer, W. H. Wachter, J. A. B. W. d. G. C., Ed.; Berlin, New York, **1987**.

Pfleiderer, W. *Chemistry and Biology of Pteridines and Folates*, Edit., Ayling, J. E.; Nair, M. G.; Baugh, M.; Plenum Press. **1993**.

Pirie, A.; Simpson, D. M. *Biochem. J.* **1946**, *40*, 19.

Purmann, R. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1940**, *544*, 182–190.

Purmann, R. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1941**, *548*, 284–292.

R

Ravanat, J. L.; Cadet, J. *Chemical Research in Toxicology* **1995**, *8*, 379–388.

Ravanat, J. L.; Douki, T.; Cadet, J. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* **2001**, *63*, 88–102.

Reid, L. O.; Roman, E. A.; Thomas, A. H.; Dántola, M. L. *Biochemistry* **2016**, *55*, 4777–4786.

Reid, L. O.; Castaño, C.; Dántola, M. L.; Lhiaubet-Vallet, V.; Miranda, M. A.; Marín, M. L.; Thomas, A. H. *Dyes and Pigments* **2017**, *147*, 67–74.

Rokos, H.; Beazley, W. D.; Schallreuter, K. U. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *292*, 805–811.

S

Sancar, A. *Chemical reviews* **2003**, *103*, 2203–37.

Scaiano, J. *CRC handbook of organic photochemistry*; Scaiano 1945-, J. C. J. C., Ed.; CRC Press: Boca Raton, Fla, **1989**; *Vol. II*.

Schallreuter, K. U.; Wood, J. M.; Pittelkow, M. R.; Gütlich, M.; Lemke, K. R.; Rçdl, W.; Swanson, N. N.; Hitzemann, K.; Ziegler, I. *Science* **1994**, *263*, 1444–1446. (a)

Schallreuter, K. U.; Wood, J. M.; Ziegler, I.; Lemke, K. R.; Pittelkow, M. R.; Lindsey, N. J.; Gütlich, M. *Biochimica et Biophysica Acta* **1994**, *1226*, 181–192. (b)

Schallreuter, K. U.; Moore, J.; Wood, J. M.; Beazley, W. D.; Gaze, D. C.; Tobin, D. J.; Marshall, H. S.; Panske, A.; Panzig, E.; Hibberts, N. A. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* **1999**, *4*, 91–96.

Schallreuter, K. U.; Moore, J.; Wood, J. M.; Beazley, W. D.; Peters, E. M. J.; Marles, L. K.; Behrens-Williams, S. C.; Dummer, R.; Blau, N.; Thöny, B. J. *J. Invest. Dermatol.* **2001**, *116*, 167–174.

Schöpf, C.; Wieland, H. *Ber. Deut. Chem Ges.* **1926**, *59*, 2067.

Schöpf, C.; Reichert, R. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1941**, *548*, 82–94.

Schuster, G. B. *Accounts of Chemical Research* **2000**, *33*, 253–260.

Scwuink, I.; Manzini, M. *Arch. Genetik* **1973**, *46*, 41.

Serrano, M.P.; Borsarelli, C.D.; Thomas, A. *Photochem. Photobiol.* **2013**, 1456–1462.

- Serrano, M.P.; Ph. D. Thesis; La Plata; **2014**.
- Serrano, M.P.; Lorente, C.; Borsarelli, C.D.; Thomas, A. *ChemPhysChem* **2015**, *16*, 2244–2252.
- Serrano, M.P.; Vignoni, M.; Lorente, C.; Vicendo, P.; Oliveros, E.; Thomas, A. *Free Radical Biology and Medicine* **2016**, *96*, 418–431.
- Serrano, M. P.; Estébanez, S.; Vignoni, M.; Lorente, C.; Vicendo, P.; Oliveros, E.; Thomas, A. H. *New J. Chem.* **2017**, *41*, 7273–7282.
- Sheu, C.; Foote, C. S. *Journal of the American Chemical Society* **1993**, *115*, 10446–10447.
- Shi, Y.; Huang, C.; Wang, W.; Kang, J.; Yao, S. *Radiation Physics and Chemistry* **2000**, *58*, 253–260.
- Song, Q.-H.; Hwang, K. C. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2007**, *185*, 51–56.
- Soniat, M.; Martin, C. B. *Pteridines* **2009**, *20(4)*, 124–129.
- Steenken, S.; Jovanovic, S. V. *Journal of the American Chemical Society* **1997**, *119*, 617–618.
- Stryer, L.; Berg, J. M.; Timoczko, J. L. *Bioquímica*, 6ta. edición, **2008**.
- Suárez, G.; Cabrerizo, F. M. F.; Lorente, C.; Thomas, A. H.; Capparelli, A. L. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2000**, *132*, 53–57.

T

- Tajmir-Riahi, H. A.; Ahmad, R.; Naoui, M.; Diamantoglou, S. *Biopolymers*, **1995**, *35*, 493–501. (a)
- Tajmir-Riahi, H. A.; Neault, J. F.; Naoui, M. *FEBS Lett.* **1995**, *370*, 105–108. (b)
- Thomas, A. H.; Feliz, M. R.; Capparelli, A. L. *Transition Metal Chemistry* **1996**, *21*, 317–321.
- Thomas, A. H.; Suárez, G.; Cabrerizo, F. M.; Martino, R.; Capparelli, A. L. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2000**, *135*, 147–154.
- Thomas, A. H.; Suarez, G.; Cabrerizo, F. M.; Capparelli, A. L. *Helvetica Chimica Acta* **2001**, *84*, 3849–3860.
- Thomas, A. H.; Suárez, G.; Cabrerizo, F. M.; García Einschlag, F. S.; Martino, R.;

Baiocchi, C.; Pramauro, E.; Capparelli, A. L. *Helvetica Chimica Acta* **2002**, *85*, 2300–2315. (a)

Thomas, A.; Lorente, C.; Caparelli, A.L.; Pokhrel, M. R.; Braun, A.M.; Oliveros, E. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1*, 421–426. (b)

Thomas, A.; Lorente, C.; Caparelli, C. G. Martínez; M. R.; Braun, A.M.; Oliveros, E. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2003**, *2*, 245 – 250.

Thomas, A. H.; Serrano, M. P.; Rahal, V.; Vicendo, P.; Claparols, C.; Oliveros, E.; Lorente, C. *Free radical biology & medicine* **2013**, *63*, 467–75. (a)

Thomas, A. H.; Lorente, C.; Roitman, K.; Morales, M. M.; Dántola, M. L. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* **2013**, *120*, 52–8. (b)

Thomas, A. H.; Catalá, A.; Vignoni, M. *Biochim. Biophys. Acta* **2016**, *1858*, 139–145.

Torun, L.; Morrison, H. *Photochem. Photobiol.* **2003**, *77*, 370–375.

Turro, N. J. *Modern Molecular Photochemistry*; Univeristy Science Books, 1991.

V

Van Daele, J.; Blancquaert, D.; Kiekens, F.; Van Der Straeten, D.; Lambert, W. E.; Stove, C. P. *Food Chemistry.* *2016*, *194*, 1189 – 1198

Vignoni, M.; Cabrerizo, F. M.; Lorente, C.; Claparols, C.; Oliveros, E.; Thomas, A. H. *Organic & biomolecular chemistry* **2010**, *8*, 800–10.

Lhiaubet-Vallet, V.; Cuquerella, M. C.; Castell, J. V.; Bosca, F.; Miranda, M. A. *Journal of Physical Chemistry B* **2007**, *111*, 7409–7414.

Viscontini, M.; Hadron, E.; Karrer, P. *Helv. Chim. Acta* **1957**, *40*, 579.

Viscontini, M.; Hummel, W.; Fischer, A. *Helv. Chim. Acta* **1970**, *53*, 1207.

Von Sonntag, C.; Schuchmann, H. P. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 1229–1253.

Von Sonntag, C.; Schuchmann, H. P. *The Chemistry of Free Radicals: Peroxyl Radicals* **1997**, 173–234.

W

Wagner, J.R.; van Lier, J.E.; Berger, M.; Cadet, J. J. Am. Chem. Chem. Soc **1994**, *116*, 2235–2242.

Wan, C.; Fiebig, T.; Schiemann, O.; Barton, J. K.; Zewail, A. H. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **2000**, *97*, 14052–14055.

Watson, J. D.; Crick, F. H. C. Nature **1953**, *171*, 737–738.

Wayne, C. E.; Wayne, R. P. Photochemistry; Oxford Univerity Press: Oxford, **1996**.

Wei, H.; Cai, Q.; Rahn, R.; Zhang, X. Free Radical Biology and Medicine **1997**, *23*, 148–154.

Wieland H.; Schöpf, C. . ; *Ber. Deut. Chem Ges* **1925**, *58*, 2178. (a)

Wieland, H.; Metzger, H.; Schöpf, C.; Bülow, M. *Liebigs Ann. Chem.* **1925**, *507*, 261. (b)

Wondrak, G. T.; Jacobson, M. K.; Jacobson, E. L. Photochemical & photobiological sciences: Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology **2006**, *5*, 215–37.

Wood, P. D.; Redmond, R. W. Journal American Society **1996**, *118*, 4256–4263.

Z

Ziegler, I. Med. Res. Rev. **1990**, *10*, 95– 114.

ANEXO: ABREVIATURAS Y NOMENCLATURA

6,4-fotoproductos	aductos pirimidina (6,4) pirimidona
A	absorbancia
ACN	acetonitrilo
Ade	adenina
ADN	ácido desoxirribonucleico
Bip	biopterina
bp	pares de bases
C	carbono
Cap	6-carboxipterina
CPD	dímeros ciclobutil pirimidina
Cyt	citosa
ΔA	diferencia de absorbancia
dA	2'-desoxiadenosina o adenosina
dA ₁₀	5'-d(AAAAAAAAAA)-3'
dAMP	2'-desoxiadenosina 5'-monofosfato
dC	2'-desoxicitidina o citidina
dC ₅	5'-d(CCCCC)-3'
DCl	ácido clorhídrico deuterado
dCMP	2'-desoxicitidina 5'-monofosfato
$\Delta E_{0,0}^T$	diferencia de energía electrónica entre el estado excitado triplete y el fundamental
dG	2'-desoxiguanosina o guanosina
dG ₅	5'-d(GGGGG)-3'
dGMP	2'-desoxiguanosina 5'-monofosfato
Dmp	6,7-dimetilpterina
D ₂ O	agua deuterada
dT	2'-desoxitimidina o timidina
dT ₅	5'-d(TTTTT)-3'

dT ₁₀	5'-d(TTTTTTTTTT)-3'
dTMP	2'-desoxitimidina 5'-monofosfato
EROs	especies reactivas de oxígeno
ESI	ionización electrospray
Φ_{Ac}	rendimiento cuántico del actinómetro
Φ_{Δ}	rendimiento cuántico de generación de oxígeno singlete
Φ_{em}	rendimiento cuántico de emisión
Φ_F	rendimiento cuántico de fluorescencia
FL	detector de fluorescencia (del HPLC)
Fop	6-formilpterina
Φ_{-R}	rendimiento cuántico de consumo de reactivo
Φ_{ref}	rendimiento cuántico de la referencia
GTTTT	5'-d(GTTTT)-3'
Gua	guanina
H ₄ Bip	5,6,7,8-tetrahidrobiopterina o tetrahidrobiopterina
HCOOH	ácido fórmico
H ₂ O ₂	peróxido de hidrógeno
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
I _A	intensidad de radiación absorbida
IC	conversión interna
I ⁰ _{em}	intensidad de emisión en ausencia de desactivador
I _{em}	intensidad de emisión en presencia de desactivador
I _F	intensidad de radiación fluorescente
ISC	cruce entre sistemas
k_d	constante de desactivación no radiativa de ¹ O ₂
k_{em}	coeficiente de velocidad de emisión espontánea
k_F	constante de velocidad de emisión espontánea
KI	yoduro de potasio
k_q	constante de desactivación física
k_{qS}	constante de desactivación de S ₁

k_{qT}	constante de desactivación de T_1
k_r	constante de reactividad química
K_{SV}	constante de Stern-Volmer
k_T	constante bimolecular de desactivación total de 1O_2
k_t	constante de desactivación del estado excitado triplete
λ_{em}	longitud de onda de emisión
λ_{ex}	longitud de onda de excitación
λ_F	longitud de onda del máximo de emisión de fluorescencia
LFP	fotólisis de destello láser
λ_P	longitud de onda del máximo de emisión de fosforescencia
Lum	lumazina
Mep	6-metilpterina
MS	espectrometría de masas
m/z	relación masa/carga
NaOD	hidróxido de sodio deuterado
Nep	neopterina
NH ₄ Ac	acetato de amonio
NIR	infrarrojo cercano
$O_2^{\bullet-}$	anión superóxido
1O_2	oxígeno molecular singlete
PDA	detector de arreglo de diodos (del HPLC)
PDI	inactivación fotodinámica
P.M.	peso molecular
Ptr	pterina
$^1Ptr^*$	estado excitado singlete de pterina
$^3Ptr^*$	estado excitado triplete de pterina
Q	desactivador o <i>quencher</i>
$q_{p,\lambda}^0$	flujo de fotones incidente
S_1	estado excitado singlete de menor energía
Se	señal obtenida por el equipo

Sens	sensibilizador o fotosensibilizador
Sens [*]	sensibilizador o fotosensibilizador en un estado electrónico excitado
SOD	superóxido dismutasa
T _{amb}	temperatura ambiente
T ₁	estado excitado triplete de menor energía
τ^0	tiempo de vida de la especie emisora en ausencia de desactivador
τ	tiempo de vida de la especie emisora en presencia de desactivador
TCSPC	recuento de fotones individuales correlacionados temporalmente
τ_F	tiempo de vida de fluorescencia
Thy	timina
t _i	tiempo de irradiación
τ_P	tiempo de vida de fosforescencia
t _R	tiempo de retención
TRES	espectros de emisión con resolución temporal
TRIS	tris(hidroximetil)aminometano
Trp	triptófano
TSPC	recuento de fotones individuales correlacionados temporalmente
τ_T	tiempo de vida del estado excitado triplete
TTET	Transferencia de energía triplete-triplete
TTGTT	5'-d(TTGTT)-3'
Tyr	tirosina
UPLC	cromatografía líquida de ultra – alta resolución
UV	ultravioleta
VR	relajación vibracional